0115-9552201a





A1

PCT WELTORGANISATION FOR OBISTICES BIGENTUM

Internationale above

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) WO 98/31790

(51) Internationale Patentidassification 6:

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

C12N 9/16, 9/18, 1/15, C12P 21/02, C11B 3/00

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

23. Juli 1998 (23.07.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/00081

(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Januar 1998 (08.01.98)

(30) Prioritätsdaten: 197 01 348.1

DB 16. Januar 1997 (16.01.97)

(71) Annochter (für alle Bestimmunguttagen ausser US): RÖHM GMBH [DE/DE]; Kirschenallee, D-64293 Darmstadt (DE).

(75) Refinder/Ammelder (nur für US): LÖFFLER, Pridolin [DE/DE]; Kurl-Henkolmann-Weg 4, D-64625 Benscheim (DE). JUNGSCHAFFER, Gerald (DE/DB): Hahnleiner Strasse 1A, D-64665 Alsbach-Harmlein (DE), KHANH, Quoc. Nguyen [DE/DB]; Am Tunnenberg 9, D-64385 Reichelstein (DE). SCHUSTER, Prwin (DE/DE); Damstädter Strasse 237, D-64625 Bensbeite Auerbach (DE). SPRÖSSLER, Bruno [DE/DE]; Auf der Schmetz 93, D-64380 Roldorf (DE) WOLF, Sabine [DE/DE]; Othbergstrasse 44, D-64853 Otzberg (DE)

Knots & Weisert, WEISERT, Amelita Thomas-Wimmer-Ring 15, D-80539 Minchen (DB). (74) Anwalt:

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN. MW, MX, NO, NZ, PL, PT. RO, RU, SD, SB, SG, SL, SK, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR. GB, GR. IE, IT, LU, MC, NL, PT, SB), OAPI Patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, 1G).

Veröffendlicht

Mit internationalem Recherchenbertcht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffemlichung wird wiederholt falls Anderungen ebweffen-

(54) Tide: PROTEIN WITH PHOSPHOLIPASE ACTIVITY

(54) Bernichmung: PROTEIN MIT PHOSPHOLIPASEAKTIVITÄT

The invention concerns a protein with phorpholipase activity which is characterized in that it comprises the mature sequence of Aspergillus lysophospholipase or a sequence derived therefrom and can be cleaved at at least one point. In the event of cleavage, either Aspergius tysophospholipase of a sequence derived discussion and ball to consider the post and use event of cleavage, either the cleavage parts are bonded via at least one bond which can be cleaved under reduction conditions, or at least one of the non-cleaved the cleavage parts are bonded via at least one bond which can be cleaved under reduction conditions, or at least one of the non-cleaved the cleaved parts are nonneed via at gent one come which can be measured under reducing this protein by fermiculation in a suitable culture parts has phospholipase activity. The invention further concerns a process for producing this protein by fermiculation in a suitable culture parts has phospholipase activity. parts has phospholipase activity. The siventiest tracted in a process to process and process by restaurant in a solitable collaborate in solitable manner and itolating the protein with phospholipase random of a host organism which produces lysophospholipase transformed in solitable manner and itolating the protein with phospholipase random of a host organism which produces lysophospholipase random in an action in all others all others are action to the contract of the contr activity from the cell-free culture filtrate, fermentation being carried out in an acidic to slightly affinitive range.

(57) Zurammeniassung

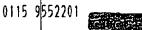
Die Erfindung betrifft ein Protein mit Phospholipsseuktivität, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die reife Sequenz der Die Ernnaung deutun ein Finden und Findensprangeren besitzt und an mindestens einer Stelle gespalten sein kann, wobei im Aspergilbe-Lyxophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und an mindestens einer Stelle gespalten sein kann, wobei im von den unverknupmen spassuusken mankessens enna Ausspannigen Lysophospholipase produzierenden Winsorganismus in einem geeigneten durch Fernenation eines in geeigneter Weise transformierten Lysophospholipase produzierenden Winsorganismus in einem geeigneten durch Fernenation eines in geeigneten Weise transformierten Lysophospholipase produzierenden Winsorganismus in einem geeigneten down Fernentation eines in geeignen weise transcrimenten Lysophoophoophoop processing with the state in einem geeigneten Kulturfiltrit, wobel man die Fermentation im Kulturfiltrit, wobel man die Fermentation im samen bis leicht alkalischen Bestich durchführt.

EPO-DG 1

3 1. 08. 2004

96







LEDICLICE ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten zuf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemitse dem veröffentlichen.

rei	ADIAI COMICIATIO		1				00
ALM AT AUZ ABBERT BEG BUT BY CAP COM COUCE BY BE	Albanian Armenica Onterralch Australian Asschaldichna Boarden-Hersagowina Bartados Balgien Burkine Parb Boulgarien Beala Branilion Belar Beala Zestvalairikanische Republik Kanada Zestvalairikanische Republik Kango Schweiz Côto d'Ivoira Kanaren Chion Kuha Tachechischa Republik Desschlend Dintrourk Eathand	PI PE GASCIE EL ET PECCE EL	Spanier Proplend Prenkroich Gabus Veningtes Königruich Georgien Ghann Guines Griechenkend Ungarn Friand Israel Is hand Railen Japan Kenia Riegishtaa Demokratische Volkssepphik Kozea Rapublik Korea Rapublik Korea Kanachatan St. Lucia Llechtersruin Sr. Lucia Llechtersruin Liburia	LS LT LU LV MC MAD MG MK MN MR NE NE NE RO RU SD SG SG	Lesotho Lizanon Laxumburg Lestland Monaco Republik Moldan Madagaster Die chemafige Jagochwische Republik Manedonica Ibial Mongolal Matterinoleo Matterinoleo Miger Niederlande Norweges Nesszeeland Potes Portugal Rumbiska Russrische Podesation Sudao Schwesten Singspor	SIESEN SEL TO TENTE TO THE TENT	Slowenies Slowenie Slowenie Schegel Swediken Tothed Toge Tedactikhen Terknesisten Tirkei Trinkiel Ultraine Ultraine Ultraine Ultraine Ultraine Victore Victore Jepoulswien Zimbalwe









WO 98/31790

PCT/RP98/00081

PROTEIN MIT PHOSPHOLIPASEAKTIVITÄT

1 -

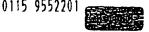
Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Protein mit Phospholipaseaktivität, das die reife Sequenz der Aspergillus-Lysophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und an mindestens einer Stelle gespalten sein kann, wobei gegebenenfalls die Spaltstücke entweder über mindestens eine unter reduzierenden Bedingungen spaltbare Bindung verknüpft sind oder von den unverknüpften Spaltstücken mindestens eines Phospholipaseaktivität besitzt. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Produktion dieses Proteins sowie die Verwendung dieses Proteins zur Entschleimung von pflanzlichen Ölen und als Backhilfsmittel.

Bei der Entschleimung von Speiseöl werden nicht hydratisierbare Phospholipide durch Phopholipase wasserlöslich gemacht und so schonend, kostensparend und umweltfreundlich aus dem Speiseöl entfernt. In der europäischen Patentanmeldung 0 513 709 (Rohm/Lurgi) wird erstmals ein wirksames enzymatisches Verfahren zur Entschleimung vorgestellt. Dabei wird ein mit Wasser vorentschleimtes Speiseöl mit einer wäßrigen Lösung einer Phospholipase zu Tröpfchen kleiner 10 μm emulgiert. Nach der Hydrolyse (pH 3 bis 6, Temperatur 50 bis









PCT/KP98/00081

- 2 -

70°C) wird die wäßrige Phase abgetrennt. Das enzymatische Entschleimungsverfahren wurde als "EnzyMax-Verfahren" von der Firma Lurgi in der Speiseölindustrie eingeführt. In der DE 43 39 556 wird als weitere Variante dieses Verfahrens die Wiederverwendung des Enzyms beschrieben, indem man das Enzym aus einer gebrauchten, schlammhaltigen wäßrigen Phase durch Zusatz von Tensiden oder Lösungsvermittlern ablöst und als weitgehend schlammfreie, enzymhaltige Lösung wiederverwendet.

Die Bereitstellung der erforderlichen Mangen an Enzym für die Betreibung eines großtechnischen Verfahrens kann nur mit Hilfe von Mikroorganismen gedeckt werden. Es besteht also ein Bedarf nach einer mikrobiellen Quelle, die erlaubt, das Enzym Phospholipase in unbeschränkten Mengen zu produzieren. In der DE-OS 195 27 274.9 vom 26.07.1995 (Röhm/Lurgi) wird beschrieben, daß in Asperyillus niger eine geeignete Phospholipase gefunden wurde. Sie spaltet Lecithin zu Lysolecithin, ist aber auch in der Lage Lysolecithin weiter zu spalten zum Phosphatidylcholin. Reine Lysophospholipasen aus Asperyillus, die nur Lysolecithin zu spalten vermögen, sind im Entschleimungsprozeß wirkungslos. Das gilt auch für die nicht acylspaltenden Phospholipasen C und D.

Ferner können Phospholipasen auch als Backhilfsmittel zur Verbesserung der Verarbeitung des Teigs verwendet werden.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine kostengünstige Phospholipase in hoher Reinheit herzustellen. Die Phospholipase soll durch einen transformierten Wirtsorganismus in großen Mengen produziert werden können. Mit dem Enzym sollen Präparate hergestellt werden können, die sich besonders gut zur Hydrolyse von Phospholipiden und somit zur Klärung von Stärkehydrolysaten und zur Herstellung von Backhilfsmitteln eignen.



- 3 -





WO 98/31790

wird.

PCT/EP98/00081

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch ein Protein mit Phospholipaseaktivität, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die reife Sequenz der Aspergillus-Lysophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und an mindestens einer Stelle gespalten sein kann, wobei im Falle einer Spaltung die Spaltstücke entweder über mindestens eine unter retung die Spaltstücke entweder über mindestens eine unter reduzierenden Bedingungen spaltbare Bindung verknüpft sind oder von den unverknüpften Spaltstücken mindestens eines Phospholipaseaktivität besitzt. Ferner wird diese Aufgabe gelöst durch ein Protein mit Phospholipaseaktivität, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es von einem Antikörper gegen gereinigte Phospholipase aus Aspergillus foetidus RH 3046 erkannt

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß ein mit der aus Aspergillus isolierbaren Desoxyribonukleinsäure (DNA) gemäß der DE-OS 196 20 649.9 transformierter Mikroorganismus nicht nur eine Lysophospholipase codiert, sondern unter bestimmten Kulturbedingungen auch in eine Phospholipase prozessiert wird. Die Phospholipase besitzt somit die gleiche Primärstruktur wie die Lysophospholipase, jedoch eine andere Sekundår- und Tertiårstruktur und somit andere physiologische Eigenschaften. Die entsprechende Sequenz ist in SEQ ID No. 1 der DE-OS 196 20 649.9 dargestellt. Fine weitere Phospholipase codierende Sequenz wurde aus Aspergillus niger isoliert, sie unterscheidet sich in nur 6% der Aminosauren von der homologen Sequenz aus Aspergillus foetidus. Sowohl die Phospholipase aus Aspergillus niger wie die Lysophospholipase aus Aspergillus foetidus bestehen aus 270 Aminosauren und haben ein Molekulargewicht von 36000 Da (siehe SEQ ID No. 1+2). Bezüglich des Erhalts der transformierten Mikroorganismen wird auf die Offenbarung der DE-OS 196 20 649.9 Bezug genommen. Eine Phospholipase aus Aspergillus wurde bisher im Stand der Technik nicht beschrieben. Die Druckschrift Nakaya







PCT/EP98/00081

1. 013

- 4 -

et al., Eur. J. Biochem. 1990, 193 (1) 31-38 beschreibt ein Protein, dessen Sequenz der Phospholipase A2 ähnlich ist.

Durch proteinchemische Methoden ließ sich Phospholipase von Lysophospholipase trennen und hochgereinigt gewinnen. Beim Vergleich der gereinigten Phospholipase und Lysophospholipase ergaben sich folgende Unterschiede:

- Die Molekulargewichte von Phospholipase umd Lysophospholipase aus Aspergillus fostidus, gemessen mit der SDS-Gelelektrophorese, betragen unter reduzierenden Bedingungen ca. 30000 Da für Phospholipase und ca. 36000 Da für Lysophospholipase, unter nicht reduzierenden Bedingungen dagegen liegen sie für beide Enzyme gleich bei ca. 36000 Da. Unter reduzierenden Bedingungen zerfällt die Phospholipase in zwei Ketten, von denen die größere (30000 Da) im Elektrophoresegel erfaßt wird. Das Teilstück in der Größe von ca. 6000 Da kann aus methodischen Gründen im gleichen Elektrophoresegel nicht nachgewiesen werden, jedoch kann man aus diesem Befund ableiten, daß Phospholipase aus zwei Peptidketten besteht. Diese Vorstellung wird durch das Ergebnis der Proteinsequenzierung bestätigt.
- Die Proteinsequenzierung der Phospholipase aus Aspergillus foetidus ergab eine hohe Übereinstimmung mit der Sequenz der Lysophospholipase, jedoch auch Unterschiede. Bei Phospholipase wurden zwei NH2-Termini im Verhältnis 1:1 gefunden, bei Lysophospholipase dagegen nur einer. Einer der beiden NH2-Termini der Phospholipase gehört zu einem 6000 Da-Peptid, während der andere der NH2-Terminus des 30000 Da-Proteins ist. Während das kleinere Peptid mit den Aminosäuren 1 bis 44 des reifen Lysophospholipase-Proteins (vgl. Sequenz ID No. 1 in DE-OS 196 20 649.9) übereinstimmt, entspricht die Sequenz des 30000 Da-Proteins den Aminosäuren 45 bis 270









PCT/EP98/00081

- 5 -

der Lysophospholipase (vgl. Sequenz ID No. 1 in DE-OS 196 20 649.9).

Dieser Befund legt nahe, daß die Phospholipase aus Aspergillus foetidus durch Prozessierung des Lysophospholipase-Proteins entstehen kann, wobei noch ungeklärt ist, ob die Prozessierung innerhalb oder außerhalb der Zelle stattfindet und in welcher Weise sie abläuft. Die Beziehungen zwischen Phospholipase und Lysophospholipase sind in Figur 1 dargestellt.

Weiter unterscheiden sich Phospholipase und Lysophospholipase in ihren isoelektrischen Punkten, ihren pH- und Temperaturoptima sowie sehr deutlich in ihren Temperaturstabilitäten. In der folgenden Tabelle werden diese Werte gegenübergestellt.

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von Phospholipase und Lysophospholipase aus Aspergillus foetidus

	FIGE	Lysophos- pholipase
Molgewicht (SDS-Gel, reduz.) Molgewicht (SDS-Gel, nicht-reduz.) Isoelektr. Punkt Temperatur-Optimum pH-Optimum pH-Stabilität (1 Std. bei 60°C)	30000 Da 36000 Da pH 4,3 50°C pH 3-4 pH 3,5 >75% Restakt.	36000 Da 36000 Da pH 4,2 55°C pH 4,5 pH 4,5

Zum Erhalt der Phospholipase an Stelle der Lysophospholipase aus den betreffenden Mikroorganismen sind die Fermentationsbedingungen wesentlich. Wesentlich für die Bildung der Phospholipase ist die Durchführung der Kultur in einem sauren bis leicht alkalischen Medium. Der pH-Wert liegt dabei geeigne-







WO 98/31790

PCT/EP98/00081

- 6 -

terweise in einem Bereich von 2 bis 9, bevorzugt 3 bis 8. Unter diesen Bedingungen wird bevorzugt Phospholipase gebildet. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Zunächst wird ein geeigneter Wirt ausgewählt mit dem Ziel einer möglichst einfachen Herstellung der Phospholipase. Obwohl viele Arten von Schimmelpilzen als mögliche Wirte in Betracht kommen, wie zum Beispiel Vertreter der thermophilen Gattungen Rumicola, Thermomyces und Mucor, der Gattungen Rhizopus, Absidia, Chaetomium, Trichoderma, Thielavia, Penicillium und Cephalosporium, wurden bevorzugt Arten der Gattung Aspergillus verwendet. Nach Transformation mit den erfindungsgemäßen Plasmiden lassen sich Transformanten isolieren, die, verglichen mit den Wirten, Phospholipase in großen Mengen produzieren. Bevorzugt ist der transformierte Wirtsorganismus ein Aspergillus-Stamm der Arten Aspergillus oryzae, Aspergillus sojae, Aspergillus niger, Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus ellipticus, Aspergillus aculeatus, Aspergillus carbonarius oder Aspergillus phoenicis oder ein Trichoderma-Stamm der Arten Trichoderma viride, Trichoderma longibrachiatum oder Trichoderma reesei.

Eine Transformante, die durch Cotransformation eines Wirtsstammes mit einem Selektionsplasmid, bevorzugt mit pAN7-1, p3SR2 oder pSTA10, und einem Expressionsplasmid, bevorzugt mit pKC3, pKC9, pKC12 oder pKCN2, hergestellt wird, züchtet man in einer für den Wirtsstamm üblichen Nährlösung, die mindestens eine verwertbare C-Quelle, wie z.B. Maisschrot, Stärke, Dextrin aus Stärke, und mindestens eine verwertbare organische N-Quelle, wie z.B. Maisquellwasser, Hefeautolysat, Sojamehl, Sojaprotein oder -pepton allein oder in Kombination mit anorganischen N-Quellen wie Ammoniumsalzen oder Nitraten, enthält und nach der Sterilisation auf einen sauren bis leicht alkalischen pH-Wert eingestellt wird. Die Nährlösung kann durch Zugabe von Substanzen, die in besonderem Maße die







PCT/EP98/00081

- 7 ~

Bildung der Phospholipase erhöhen, ergänzt werden. Phospholipide aus Soja enthalten solche Substanzen, doch kommen sie auch in anderen Stoffklassen, wie z.B. den Polyoxyethylenethern vor. Nach Beimpfen der sterilisierten Nährlösung mit Konidien oder vegetativem Mycel der Transformante wächst diese unter Belüftung bei Temperaturen zwischen 20° und 60°C, vorzugsweise zwischen 25° und 45°C, und produziert die erfindungsgemäße Phospholipase. Während der Kultivierung wird der pH-Wert der Kultur durch Säure- oder Laugezugabe korrigiert, so daß er im sauren bis schwach alkalischen Bereich, vorzugs- . weise zwischen pH 3 und 8, gehalten wird. Nach 48 bis 120 Stunden Kulturdauer kann man die Phospholipase gewinnen, indem man die unlöslichen Nährlösungsreste und die Biomasse abtrennt, was ublicherweise durch Filtration geschieht, und das Filtrat mit üblichen Methoden, wie z.B. durch Ultrafiltration, konzentriert. Das Konzentrat (Retentat) kann zur Entschleimung von Pflanzenölen oder zur Behandlung von Phospholipiden eingesetzt werden. Perner kann die Phospholipase auch zur Verbesserung der rheologischen Eigenschaften von Lebensmitteln verwendet werden.

Die folgenden Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Deutschland, gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegt:

A. oryzae RH 3745: Hinterlegungsnummer DSM 11263

(Hinterlegungsdatum: 11.11.1996)

A. ellipticus RH 3886: Hinterlegunganummer DSM 11284 ...

(Hinterlegungsdatum: 11.11.1996)

A. foetidus RR 3046: Hinterlegungsnummer DSM 10652

(Hinterlegungsdatum: 24.04.1996)

B. coli DH5a pKC3: Hinterlegungsnummer DSM 10653

(Hinterlegungsdatum: 24.04.1996)





PCT/EP98/00081

-8-

E. coli DH5a pKC9: Hinterlegungsnummer DSM 10654 (Hinterlegungsdatum: 24.04.1996)

E. coli DHSa pKCl2: Hinterlegungsnummer DSM 10655

(Hinterlegungsdatum: 24.04.1996)

E. coli pKCN2: Hinterlegunganummer: DSM 11352

(Hinterlegungsdatum: 23.12.1996)

A. niger RH 3909: Hinterlegungsnummer DSM 11353

(Hinterlegungsdatum: 23.12.1996)

Die Erfindung wird anhand der nachstehenden Beispiele und . Figuren näher erläutert.

Die Pigur 1 zeigt die Prozessierung des Lysophospholipasegens aus Aspergillus und den Erhalt der Phospholipase.

Die Figur 2 zeigt die Konstruktion des Plasmids pKCN2.

Beispiele

Beispiel 1

Konstruktion des Expressionsvektors pKCN2

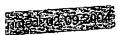
Isolierung des Lysophospholipase-Gens aus A. niger NRRL3

Die chromosomale DNA von A. niger NRRL3 wurde nach einer Vorschrift von Hynes, M.J. et al. (1983), Mol. Cell. Biol. 3, 1430-1439, isoliert.

Die erhaltene hochmolekulare DNA wurde mit Sau3AI partiell hydrolysiert und durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation nach ihrer Größe fraktioniert. DNA-Moleküle der Größe von 9 bis 20 kb wurden in BamHI/EcoRI-hydrolysierte EMBL3-DNA insertiert und in-vitro verpackt.









WO 98/31790.

PCT/EP98/00081

- 9 -

Zur Identifizierung des chromosomalen Lysophospholipase-Gens in einer Lambda EMBL3-Genbank wurde das HindIII/SalI-cDNA Fragment aus dem Plasmid pKC1/36 als Hybridisierungssonde verwendet. Das Plasmid pKC1/36 enthielt die aus A. foetidus RH 3046 isolierte Lysophospholipase-CDNA.

Nach der Hybridisierung und mehrfacher Vereinzelung ließen sich zwei positive Klone identifizieren. Die Phagen-DNA von Klon Nr. 1 wurde prapariert und mit Bamil hydrolysiert. wies nach der Southern-Hybridisierung ein positives Signal bei ca. 9 kb auf. Das BamHI-Pragment wurde in pUC18 kloniert, und das resultierende Plasmid, welches das vollständige chromosomale Lysophospholipase-Gen enthielt, wurde als pKCN bezeichnet.

Konstruktion des Expressionavektors pKCN2

In das Plasmid pKCN2 wurde das Lysophospholipase-Gen unter Kontrolle des A. oryzae alpha-Amylase-Promotors und des A. pidulans trpC-Terminators gesetzt.

Die Isolierung des Lysophospholipase-Gens aus dem Plasmid pKCN erfolgte mit Hilfe der PCR-Methode. Bs wurden zwei Oligonukleotid-Primer mit den folgenden Sequenzen verwendet:

5'-GGA ATT CAC CTG CTA ACC ATG TTC TCT GGA CGG TTT GGA GTG-3' KC29: Met BspMI

(SEQ ID No. 3)

KC43:

5'-CG GGATCC AAG CTA TAG CAG ACA CTC TGA AAT TG-3'

AMB BamHI

(SEQ ID No. 4)







PCT/EP98/00081

- 10 -

Für die Polymerase-Kettan-Reaktion wurden in einem Reaktionsvolumen von 0,1 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM
MgCl₂, 0,2 mM dNTP (je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) je
50 pmol KC29 und KC43, 1 ng pKCN als Matrize und 2,5 U TagPolymerase vermischt. Der Ansatz wurde für 20 Zyklen (94°C,
40 sek; 40°C, 1 min; 72°C, 1 min) durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das amplifizierte Fragment gereinigt,
mit BspMI und BamHI hydrolysiert und in das mit Ncol/BamHI
gespaltene Plasmid pKE2 insertiert. Das Plasmid pKE2 enthält
den A. oryzae alpha-Amylase-Promotor und den A. nidulas trpCTerminator.

Die Konstruktion des Plasmids pKCN2 wurde durch eine Restriktionsanalyse und die anschließende Sequenzierung bestätigt.

Beispiel 2

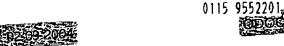
Transformationsmethode für Aspergillus- und Trichoderma reesei-Stämme

Von einer ca. zwei Wochen alten Petrischalenkultur des zu transformierenden Pilzstammes wurde eine Sporensuspension in ca. 10 ml 0,85 % NaCl durch Abschwemmen unter Zuhilfenahme eines Spatels hergestellt. Es wurden je vier 1 l-Schüttelkolben mit 100 ml Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 0,1 % Hefeextrakt mit je 1 ml Sporensuspension beimpft und ca. 16 Stunden bei 28°C auf einem Rundschüttler bei 120 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Das Mycel aus je vier Schüttelkolben wurde über einem Papierfilter geerntet und mit ca. 50 ml MP-Puffer (1,2 M MgSO4 in 10 mM Phosphatpuffer, pH 5,8) gespült. Nach dem Ablaufen des Puffers wurde das feuchte Mycel gewogen. In der Regel wurden ca. 3 bis 5 g Feuchtmycel erhalten.

Pro g Feuchtmycel wurden 5 ml MP-Puffer, 120 µl Novozym-Lôsung (1g Novozym 234 (Novo Nordisk) in 6 ml MP-Puffer) und









PCT/EP98/00081

- 11 -

25 µl ß-Glucuronidase (Sigma) zugegeben. Die Mycel-Suspension wurde 5 min in Eiswasser gestellt. Anschließend wurden 60 µl Rinderserumalbumin-Lösung (0,2 g Rinderserumalbumin in 4 ml MP-Puffer, sterilfiltriert) zugegeben, und der Ansatz wurde unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Bildung von Protoplasten wurde visuell im Mikroskop verfolgt. Wenn keine wesentliche Zunahme der Protoplastenbildung mehr festzustellen war, wurde der Ansatz zur Ernte der Protoplasten abgebrochen. Dies war in der Regel nach etwa 3 bis 5 stunden der Fall.

Die Protoplastensuspension wurde zur Abtrennung noch vorhandener grober Mycelbestandteile über ein mit MP-Puffer getränktes Glaswollefilter gegeben und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die obere Hälfte der Röhrchen wurde mit 600 mM Sorbit, 100 mM Tris/HCl, pH 7,0 überschichtet. Die Röhrchen wurden 10 min bei 2500 g zentrifugiert. Die Protoplasten wurden aus der Zwischenschicht abgenommen und in 1 M Sorbit, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 aufgenommen. Anschließend wurden die Protoplasten zweimal mit STC-Puffer (1 M Sorbit, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl₂) durch Zentrifugation bei Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl₂) durch Zentrifugation bei 1500 g gewaschen und zuletzt in 1 ml STC-Puffer aufgenommen.

Zur Transformation von A. oryzae wurden 300 µl Protoplastensuspension ca. 10 µg p3SR2 als Selektionsplasmid und 10 µg des jeweiligen Plasmids zur Expression der LPL in 25 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 zusammengegeben und 10 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden nochmals 25 µl des gleichen Plasmidgemisches und 400 µl PEG-Lösung (60% Polyethylenglykol 6000 (Pluka) in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM CaCl₂) zusammengegeben, sehr vorsichtig vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden nochmals 500 µl PEG-Lösung zugegeben, vermischt und der Ansatz für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde mit ca. 9 ml Acetamid-Weichagar (Minimalmedium mit 10 mM Acetamid als einziger N-Quelle,



-0.00





WO 98/31790

ERIC PUTTER CLARKSON ...

0115 9552201

PCT/KP98/00081

- 12 -

1 M Saccharose, 0,6 Gew.-% Agar) bei 45°C gemischt und auf vier Petrischalen mit dem gleichen Medium, jedoch mit 2,5 Gew.-% Agar (Oxoid) und zusätzlich 15 mM CsCl, verteilt. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert. Nach 6 bis 10 Tagen wurden schnell wachsende Kolonien (Transformanten) auf Acetamid-Medium ohne Saccharose überimpft, zweimal über Einzelsporkolonien gereinigt und zuletzt auf Vollmedium, z.B. Kartoffel-Dextrose-Agar, übertragen.

Die Transformation von Stämmen der Arten A. niger, A. avamori, A. japonicus oder A. foetidus kann ebenfalls mit dem Plasmid p3SR2 erfolgen. Bevorzugt wurde die Transformation jedoch mit dem Plasmid pAN7-1 ausgeführt. Die Protoplastenpraparation und die Zugabe von Plasmid-DNA erfolgt dabei in analoger Weise, wie oben für das Plasmid p3SR2 beschrieben. Statt der Zugabe von Acetamid-Weichagar wird jedoch der gesamte Transformationsansatz zu 100 ml Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 100 μg Rygromycin B/ml, 1,5 Gew.-* Agar (Oxoid) und 1 M Saccharose, abgekühlt auf ca. 45°C gegeben und vorsichtig vermengt. Der Ansatz wird dann in Portionen zu je 10 ml in Petrischalen gegeben, in denen jeweils 10 ml Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid), 1edoch ohne Hygromycin und ohne Saccharose als feste Unterschicht vorgelegt war. Nach dem Erstarren der oberen Agarschicht werden die Petrischalen bei 30 bis 37°C inkubiert. Gegen Hygromycin B resistente Transformanten können nach ca. 3 bis 10 Tagen abgeimpft werden und zur Überprüfung der Resistenz auf Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 50 µg Hygromycin B/ml und 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid) übertragen werden.

Pür die Transformation von A. sojae oder A. phoenicis wird ein drittes Selektionsprinzip genutzt, da die verwendeten Stämme dieser Art sowohl Acetamid verwerten wie auch gegen Hygromycin B resistent sind. Durch Selektion auf chlorathaltigem Nährboden werden Mutanten isoliert, deren Nitratreduk-

14

A CONTRACT





PCT/EP98/00081

- 13 -

tase-Gen (niaD) defekt ist, die also nicht mehr mit Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle wachsen (Cove, D.J. (1976) Durch Transformation mit dem Plasmid Heredity 36, 191-203). Durch Transformation mit dem Plasmid (Unkles, S.E. et al. (1989) Mol.Gen.Genet. 218, 99-pSTA10 (Unkles, S.E. et al. (1989) Mol.Gen.Genet. 218, 99-total (Unkles, S.E. et al. (1989) Mol.Gen.Genet. 2018, 99-total (Unkles, S.E. et al. (1989) Mol.Ge

Diese Methodik zur Selektion ist außer für A. sojae genauso für andere Aspergillus-Arten geeignet; die Herstellung der niad-Mutanten bedeutet allerdings einen zusätzlichen Arbeitsaufwand gegenüber der Verwendung der Hygromycin B-Resistenz oder der Acetamidverwertung.

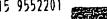
Beispiel 3

Herstellung von PL sezernierenden Transformanten

Transformanten von A. niger, A. awamori, A. foetidus, A. carbonarius und A. ellipticus

Protoplasten dieser Aspergillus-Arten wurden mit der in Beispiel 1 beschriebenen Methodik hergestellt und unter Verwendung des Plasmids pAN7-1 und jeweils einem der Plasmide pKC3,
dung des Plasmids pAN7-1 und jeweils einem der Plasmide pKC3,
pKC9, pKC12 oder pKCN2 cotransformiert. Zur Regeneration der
Protoplasten wird der Transformationsansatz wie oben beProtoplasten wird der Transformationsansatz wie oben beschrieben auf Hygromycin plattiert, die Transformanten werden
von den Regenerationsplatten isoliert, gereinigt und in
Schüttelversuchen unter Verwendung der folgenden Nährlösung









PCT/KP98/00081

- 14 -

Maltodextrin 3,75 % Maisquellpulver 3,0 KH2PO4 1,0 K2HPO4 0,7 Triton X-100 0,10 %

in Leitungswasser, 30 min bei 121°C sterilisiert,

auf Produktion von PL geprüft. Dazu wird die Biomasse der Schüttelkulturen abfiltriert und die Phospholipase-Aktivität (PLU) im Kulturfiltrat gemessen. Transformanten zeichnen sich durch gegenüber dem Wirtsstamm deutlich erhöhte Phospholipase-Aktivitāt aus.

Transformanten von A. orvzae und A. aculeatus

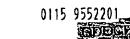
Die Protoplastierung und Transformation wird auch mit diesen Arten wie im Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Die Protoplasten werden unter Verwendung des Plasmids p3SR2 und jeweils einem der Plasmide pKC3, pKC9, pKC12 oder pKCN2 cotransformiert. Zur Regeneration der Protoplasten wird der Transformationsansatz wie oben beschrieben auf Nährboden mit Acetamid als alleiniger Stickstoffquelle plattiert, die Transformanten werden von den Regenerationsplatten isoliert, gereinigt und in Schüttelversuchen unter Verwendung der folgenden Nährlösung

> Maltodextrin 3,75 € Maisquellpulver 3,0 (NH₄)₂HPO₄ 0,5 Triton X-100 0,10 % in Leitungswasser, 30 min bei 121°C sterilisiert,

auf Produktion von PL geprüft.











PCT/EP98/00081

- 15 -

Transformanten von A. sojae und A. phoenicis

Die Stämme A. sojae RH 3782 niaD22 und A. phoenicis RH 3828 niaD, beides mach Cove (1976) hergestellte Mutanten von A. sojae RH 3782 und A. phoenicis RH 3828, werden in der nachfolgenden Nährlösung aus

Glucose (MERCK) 0,5 Malzextrakt (OXOID) 0,025 % Barto-Pepton (DIFCO) deionisiertes Wasser pH-Wert auf 5,0 einstellen; Sterilisation: 30 min bei 121°C

angezogen. Aus dem Mycel werden nach der in Beispiel 1 beschriebenen Methodik Protoplasten gewonnen und diese mit pSTA10 als Selektionsplasmid und jeweils einem der Plasmide pKC3, pKC9 oder pKC12 cotransformiert. Zur Regeneration der Protoplasten wird der Transformationsansatz mit 9 ml Weichagar (osmotisch stabilisierend) bestehend aus

0,1 M Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 1 M Saccharose (MERCK) Millipore-Wasser auf Agar (OXOID) 30 min Sterilisation bei 121°C,	29,1	(= 0,6 %)
Zugabe von: Salzlösung (7.14.2) 1 M NaNO3-Lösung	0,6	

gemischt und auf vier Agarplatten der gleichen Zusammensetzung, jedoch mit 1 % Agar hergestellt, verteilt. Nach etwa 6 bis 10 Tagen Inkubation bei 37°C werden die Transformanten von den Agarplatten isoliert, auf Nitrat-Saccharose-Agar







PCT/EP98/00081

- 16 -

durch Ausstrich gereinigt. Es wurde eine Vielzahl Transformanten durch Selektion und anschließender Reinigung auf einem Nährboden mit Nitrat als einziger N-Quelle erhalten und in Schüttelkolben unter Verwendung der folgenden Nährlösung

Maltodextrin	3,75	¥
Maisquellpulver	3,0	%
KH2P04	1,0	*
K ₂ HPO ₄	0,7	*
Triton X-100	1,0	8
in Leitungswasser,	30 mi	n bei 121°C sterilisiert,

auf Produktion von PL geprüft.

Neben Transformanten, die keine oder nur geringe Mengen von PL produzieren, sowie die nicht transformierten Wirtsstämme, werden auch solche Transformanten gefunden, die deutlich erhöhte PL-Aktivität im Kulturfiltrat aufweisen. Diese als Cotransformanten bezeichneten Stämme eignen sich zur Herstellung des Enzyms. In der Tabelle 2 sind typische Ergebnisse der PL-Bildung durch Transformanten und durch die nicht transformierten Wirte gegenübergestellt.







PCT/EP98/00081

- 17 -

Tabelle 2: Vergleich der PL-Bildung von Wirtsstämmen und . Transformanten.

Stamm bzw. Transformante	relative PL-Aktivität
	100
A. oryzae RH 3745	3000-4000
n orwane RH 3745 p35R2 pACS	2000-2500
A. oryzae RH 3745 p35R2 pKCN2	·
(100-
A. sojae RH 3782 piaD22	500-700
A. sojae RH 3782 niaD22 pSTA10 pKC9	•
	100
A. foetidus RH 3046 A. foetidus RH 3046 pAN7-1 pKC9	1000-1500
•	100
A. phoenicis RH 3828 niaD	400-600
A. phoenicis RH 3828 niaD pSTA10 pKC9	•
-	100
A. ellipticus	800-900
A. ellipticus pAN7-1 pKC12	
	100
A. heteromorphus niaD A. heteromorphus niaD pSTA10 pKC9	900-1000
	100
A. carbonarius	400-600
A. carbonarius pAN7-1 pKC9	
	100
A. aculeatus	900-1200
A. aculeatus p36R2 pKC9	
	100
A. niger	700-1000
A. niger pAN7-1 pKC12	
	100
A. awamori	600-800
A. awamori pAN7-1 pKC12	•







WO 98/31790

PCT/EP98/00981

- 18 -

Beispiel 4

Reinigung der PL aus A. fostidus

2080 ml Kulturretentat von A. foetidus RH 3788 wurden, um die elektrische Leitfähigkeit herabzusetzen, mit 3520 ml destilliertem Wasser verdünnt und mit 160 ml 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Die Probe hatte ein Volumen von 5760 ml und eine Leitfähigkeit von 7,8 ms/cm.

In einem weiteren Schritt wurde eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Fractogel (MERCK) vorgenommen. Dazu wurden 5760 ml der Enzymlösung in vier Ansätzen (à 1440 ml) auf eine DEAE-Fractogel-Säule (Höhe 278 mm, Durchmesser 100 mm) aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer A (20 mM Phosphatpuffer aus Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,0 + 15 mM NaCl) gespült. Die Elution erfolgte in einem kontinuierlichen Gradienten von Puffer A zu Puffer B (Puffer A + 1 M NaCl). Es wurde bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 70 ml/min eluiert und Fraktionen zu je 350 ml aufgefangen.

Die Fraktionen wurden auf Anwesenbeit der PL getestet. Dies geschah durch Messung der PL-Aktivität. Eine PL-Einheit ist danach definiert als die Enzymmenge, die in einer wäßrigen Lösung von Lecithin bei pH 3,5 und 40° C eine Hydrolysegeschwindigkeit von 1 μ M/min bewirkt.

Die Messung der PL-Aktivität wurde wie folgt ausgeführt:

Substrat: 1 g Epikuron 200 (Phosphatidylcholin von Fa. Lucas Meyer) + 100 g destilliertes Wasser + 5 ml 0,32 M CaCl₂-Lō-sung wurden mit dem Ultra Turrax homogenisiert.







WO 98/31790

PCT/EP98/00081

- 19 -

Analyse: 10 ml Substrat wurden mit 10 ml 1 %iger Triton X-100 Lösung (Fa. Fluka) und 5 ml 0,0033 M Zitronensäure-Monohydratlösung versetzt und 10 min bei 40°C temperiert; der pH stellt sich auf 3,4 bis 3,5 ein. 0,1 ml Enzymlösung wurden zugegeben, und das Gemisch wurde 10 min bei 40°C inkubiert. Die Enzymkonzentration im Analysenansatz sollte nicht über 2,5 U/g liegen. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde mit 0,01 M KOH auf pH 10,0 zurücktitriert, wobei die ersten 5 ml zügig zugegeben wurden und dann die Titriergeschwindigkeit verringert wurde, um ein Übertitrieren zu vermeiden.

Für den Blindwert (BW) wurde das Enzym 15 min auf ca. 95°C erhitzt und inaktiviert. Nach dem Abkühlen verdünnte man es wie für den Hauptwert (HW) und verfuhr weiter wie mit dem. Hautpwert.

Berechnund:

= PLU/g, pH 3,5 = HW (ml) - BW (ml) * 0.01 M * 1000 10 min * 0,1 ml * Enzymkonz. g/ml

In der Patentanmeldung 195 27 274.9 vom 26.07.1995 wird die Phospholipase in Lecithase-Units, LU/g angegeben. thase-Unit ist dabei jene Enzymmenge, die bei 40°C, pH 8 aus Eigelb in einer Minute 1 μM Fettsäure freisetzt. 1 LU/g, pH 8 entsprechen 108 PLU/g, pH 3,5.

Die Elution der PL setzte bei ca. 0,11 M NaCl ein. Die PLhaltigen Fraktionen aus vier Läufen wurden vereinigt (8950 ml) und über einen CH2A-Konzentrator der Fa. Amicon, Hollow-Fiber Patrone MG10.000 auf ein Volumen von 2570 ml eingeengt. Diese Probe wurde mit 782 ml 3 M Ammoniumsulfatlösung unter Rühren versetzt (Probe enthält jetzt 0,7 M Ammoniumsulfat).





WO 98/31790

PCT/EP98/00081

- 20 -

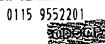
Im nächsten Schritt wurden 3352 ml der Probe auf eine PhenylSepharose 6 Fast Plow, Low Substitution-Säule (Pharmacia,
Höhe 215 mm, Durchmesser 100 mm) aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer C (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 + 0,5 M Ammoniumsulfat) nachgewaschen und mit einem kontinuierlichen fallenden Gradienten von Puffer C nach Puffer D (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0) eluiert. Die PL-haltigen Fraktionen wurden
vereint (790 ml) und mit dem Konzentrator (siehe oben) eingeengt und gegen Puffer D dialysiert; es wurden 150 ml Probe
erhalten.

In einem weiteren Schritt wurden je 30 ml der Probe in 5 Ansätzen auf eine Mono Q-(Pharmacia, 6,3 ml)-Anionenaustausch-Chromatographie-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer D gespült, und die Elution erfolgte in einem kontinuierlichen Gradienten von Puffer D zu Puffer B und setzte dabei für die PL bei ca. 200 mM NaCl ein.

Die PL-haltigen Fraktionen wurden vereint und über PD-10-Saulen (Pharmacia) gegen Puffer E (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1) dialysiert. Die Probe hatte ein Volumen von 24 ml.

Endreinigung der PL über Mono P HR5/20 (Chromatofokussierung)
Die 24 ml (siehe oben) wurden auf die MONO P-Säule (Höhe
200 mm, Durchmesser 5 mm) aufgetragen. Die Säule wurde mit
Puffer E nachgewaschen. Die Probe wurde mit Puffer F (Polybuffer 74 von Pharmacia 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und auf pH 4,0 mit 1 M HCl eingestellt) eluiert. Die
PL eluierte, nachdem das 13fache Säulenvolumen an Puffer F
die Säule passiert hatte.

Das gereinigte Protein zeigt in der SDS-Gelelektrophorese eine einheitliche Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 31000 Dalton. Der isoelektrische Punkt liegt bei ca. pH 4,3. Das auf diese Weise gereinigte Protein wurde zur Sequenzie-





.1005-02-2001

WO 98/31790

PCT/EP98/00081

- 21 -

rung verwendet. Die so isolierte Phospholipase wurde zur Gewinnung von Antikörpern in Kaninchen verwendet. Die Immunisierung wurde mit dem bei Harlowe und Lane (Lit: Ed Harlowe und David Lane, Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, und David Lane, Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) beschriebenen Standardverfahren durchgeführt. Das erhaltene Antiserum konnte direkt für Western blots (wie ebenhaltene Antiserum konnte direkt für Western blots (wie ebenfalls bei Harlowe und Lane beschrieben) eingesetzt werden, wo es spezifisch die Phospholipasebande markierte.

Beispiel 5

Entschleimung von Sojaol

200 g naßentschleimtes Sojaöl mit einem Rest-Phosphatgehalt von 160 ppm wird in einem Rundkolben auf 40°C erwärmt. Dazu gibt man 10 g Wasser, in dem 20 mg Zitronensäure und 100 Units Phospholipase enthalten sind. Das Enzym stammt aus der Fermentation einer Aspergillus niger-Transformante, die das Phospholipase-Konstrukt enthält. Die Aktivitätsbestimmung Phospholipase-Konstrukt enthält. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt bei pH 3,5. Dazu werden 10 ml 1 %iges Phosphatidyl-cholin (Epikuron 200 von Lucas Meyer), das 0,5 ml 0,32 M Cacl, enthält, mit 10 ml Triton X-100 Lösung und 5 ml 0,0033 M Zitronensäure-Monohydrat versetzt und 10 Minuten bei 40°C temperiert. 0,1 ml entsprechend verdünnter Enzymlösung werden zugegeben und 10 Minuten bei 40°C inkubiert. Mit 0,01 M KOH-Lösung wird auf pH 10 titriert. Der Blindwert (bei 95°C für 15 Minuten erhitzte Enzymlösung im Ansatz) wird abgezogen und die Berechnung gemäß Beispiel 3 vorgenommen.

Der Inhalt des Rundkolbens wird mittels einer externen Kreiselpumpe intensiv dispergiert. Dabei wird der Inhalt des Kolbens etwa einmal pro Minute durchgesetzt. Die Wasserphase liegt dabei in einer Teilchengröße von unter 1 μ . In Zeitabständen von zwei Stunden werden Proben genommen und auf Phosphorgehalt untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:







WO 98/31790

PCT/EP98/09081

- 22 -

Zeit in Stunden 0 2 4 6 8 Phosphorgehalt in ppm 160 24 12 7 3

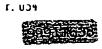
Versuche, bei denen wie beschrieben verfahren wurde, aber anstelle des Enzympräparats eine entsprechende Menge Molkenprotein, also nichtenzymatisches Protein oder Lysophospholipase des Handels (G-Zyme von Enzyme Biosystems, USA, 1000 Lysophospholipase Units pro 200 ml Sojaöl) zugesetzt wurden, konnte der Phosphorgehalt nicht unter 80 ppm gesenkt werden.

Beispiel 6

Verbesserung der Teiggualität

Der folgende Backversuch wurde mit der erfindungsgemäßen Phospholipase durchgeführt. Aus 100 Gew. Tln. Mehl, 2 Gew. Tln. Salz, 3 Gew. Tln. Backhefe, 58 bis 60 Gew. Tln. Wasser und 40 bis 50 ppm Ascorbinsaure (bezogen auf das Teiggewicht) wurde in einem Spiralkneter (Fabrikat Kemper) 2 min auf niedriger Stufe 1 und 6 min auf höherer Stufe 2 ein Teig bereitet. Dem Wasser wurden vor Beginn des Knetworgangs die Enzyme und anderen Zusätze zugegeben. Die Teigtemperatur betrug 23° bis 25°C. Nach einer Teigruhe von 20 min wurde der Teig zur Herstellung von freigeschobenem Weißbrot in 350 g-Stücke geteilt, geformt, 70 min bzw. 90 min bei 32°C und 80 % relativer Luftfeuchte gegart und 32 min bei 230°C gebacken. In der Tabelle 3 ist das Brotvolumen bei verschiedenen Enzymzusätzen angegeben. Die Backergebnisse zeigen, daß durch Zusatz von Phospholipase das Backvolumen und die Krumstruktur verbessert werden. Die stabilisierende Wirkung auf den Teig zeigt sich in den guten Backergebnissen bei verlängerter Garzeit (90 min).







PCT/EP98/00081

- 23 -

Tabelle 3: Backversuche

· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Backvolumen	*	90	aim	Gare	*	1	ruktur
nusätze/ 100 kg Mehl	70 min Gare	100	1	.050	ccm .	100		ngleich-
obne Zusatz	1000 ccm		-			107	╁╴	ngleich-
Pilzamylase	1050 ccm	105	,	.130	ccm.			äßig
Pilzamylase 10000 SKB thospholipase	1100 CCM	110		1225	cem	117		ngleich- mäßig
pilzamylase	1225 CCM	123	2	127	2 cicau	. 121		ungleich- mäßig
pilzamylase 50000 SKB + Phospholipas	1275 CCTN	1.2	28	136	55 ccm	13	0	gleich- mäßig
Pilz-Xylana		1	33	13	75 ccm	13	1	gleich- mäßig
Pilz-Xylans 1200 UXYL Pilz-Xylans 1200 UXYL +	1375 ccm		138	14	175 ccm	1	40	gleich- mäßig









PCT/EP98/00081

- 24 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: ROERM GMBH
- (B) STRASSE: Kirschenallee
- (C) ORT: Darmstadt (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 64293
- (A) NAME: LOEFFLER, fridolin
- (B) STRASSE: Karl-Henkelmann-Weg 4
- (C) ORT: Bensheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 64625
- (A) NAME: JUNGSCHAFFER, Gerald
- (B) STRASSE: Haehnleiner Strasse 1A
- (C) ORT: Alsbach-Haehnlein
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 64665
- (A) NAME: KHANH, Quoc Nguyen (B) STRASSE: Am Tannenberg 9
- (C) ORT: Reichelsheim
- (E) LAND: Deutschland (F) POSTLEITZAHL: 64385
- (A) NAME: SCHUSTER, Erwin
- (B) STRASSE: Darmstaedter Str. 237
- (C) ORT: Bensheim-Auerbach
- (E) LAND: Deutschland (F) POSTLEITZAHL: 64625
- (A) NAME: SPROESSLER, Bruno
- (B) STRASSE: Auf der Schmelz 93
- (C) ORT: Rossdorf (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 64380
- (A) NAME: WOLF, Sabine
- (B) STRASSE: Otzbergstrasse 44
- (C) ORT: Otzberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 64853



- 25 -





WO 98/31790

PCT/KP98/00081

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Protein mit Phospholipaseaktivitaet

(111) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk (B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS (D) SOFTWARE: Patentin Release \$1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1368 Basenpaare

(8) ART: Nucleotid (C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(111) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKHAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: intron

(B) LAGE: 222..275

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: intron (B) LAGE:442..486

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: intron (B) LAGE: 824..874

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: join(140..221, 276..441, 487..823, 875..1180)





WO 98/31790

PCT/EP98/00081

- 26 -

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide (B) LAGE:221..1180

(1x) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide (B) LAGE:140..220

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATGGGGAATT GGGGTCGGTA ATATGATACA GGTATAAAAO GGGGCTCGGA GGTGCAGTTG	
GATAGAAGCA TTGTGTGTGC ATTGCAGCAG TCCGTTGGTC TCACGTCTCT GGTTGCCTCG	60
AGRICULTURE OF STREET OF A STR	120
ATTGTATATA TACTGCAGG ATG TTC TCT GGA CGG TTT GGA GTG CTT TTG ACA Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr -27 -25 -20	172
GCG CTT GCT GCG CTG TGT GCT GCG GCA CCG ACA CCA CTT GAT GTG CGG A Ala Lau Ala Ala Lau Cys Ala Ala Ala Pro Thr Pro Lau Asp Val Arg	221
GTAGGTGTGC CTGATTTGAA GTGGCTGGAT AGCACTGATG AAGGTTTTGA ATAC GT Ser 1	277
GTC TCG ACT TCC ACG TTG GAT GAG CTG CAA TTG TTC TCG CAA TGG TCT Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ser Gln Trp Ser 10	125
GCC GCA GCT TAT TGC TCG AAC AAT ATC GAC TCG GAC GAC TCT AAC GTG Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Asp Ser Asn Val 20 25 30	- 373
ACA TGC ACG GCC GAC GCC TGT CCA TCA GTC GAG GAG GCG AGC ACC AAG Thr Cys Thr Ala Asp Ala Cys Pro Ser Val Glu Ala Ser Thr Lys 35 40 45	421
ATG CTG CTG GAG TTT GAC CT GTATGTTGCT CCAGTGAAAT GGATAGAACA Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu 50 55	471
CAGCTGATTG AATAG G ACA AAT AAC TIT GGA GGC ACA GCC GGT TTC CTG Thr Asn Asn Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu 60 65	520
GCC GCG GAC AAC ACC AAC AAG CGG CTC GTG GTC GCC TTC CGA GGC AGT Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser 70 75 80	568
AGE ACC ATC AAG AAC TGG ATT GCT GAT CTC GAC TTC ATC CTG CAA GAT Ser Thr Ile Lys Asn Trp Ile Ala Asp Leu Asp Phe Ile Leu Gln Asp 85 90 95	616





WO 98/31790

PCT/EP98/00081

- 27 -	
AAC GAT GAC CTC TGT ACT GGC TGC AAG GTT CAC ACT GGA TTC TGG AAG ASN ASP ASP Lee Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys 115	664
GCA TGG GAA GCC GCT GCA GAC AAT CTG ACG AGC AAG ATC AAG TCC GCG GCA TGG GAA GCC GCT GCA GAC AAT CTG ACG AGC AAG ATC AAG TCC GCG GCA TGG GAA GCC GCT GCA GAC AAT CTG ACG AGC AAG ATC AAG TCC GCG Ala TCD GLU Ala Ala Ala Asp Asn Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala 130	712
ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG ATG AGC TAT TCG GGC TAT TCG TTC TTC TTC TTC TTC TTC TTC TTC TT	760
GGC GGC GCA TTG GCT ACA CTG GGA GCA ACG GTC TTG CGA AAT GAC GGT GGC GGC GCA TTG GCT ACA CTG GGA GCA ACG GTC TTG CGA AAT GAC GGT GIV GIV Ala Leu Ala Thr Leu GIV Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp GIV 155	808
TAT AGC GIT GAA CIG GIGAGIGCIT CAGAGGGIGA TCATIAAACA GCCGGITCIG	863
ACAGTCAATA G TAC ACC TAT GGA TGT CCT CGA GTC GGA AAC TAT GCG CTG ACAGTCAATA G TAC ACC TAT GGA TGT CCT CGA GTC GGA AAC TAT GCG CTG ACAGTCAATA G TAC ACC TAT GGA TGT CCT CGA GTC GGA AAC TAT GCG CTG ACAGTCAATA G TAC ACC TAT GGA TGT CCT CGA GTC GGA AAC TAT GCG CTG ACAGTCAATA G TAC ACC TAT GGA TGT CCT CGA GTC GGA AAC TAT GCG CTG ACAGTCAATA G TAC ACC TAT GGA TGT CCT CGA GTC GGA AAC TAT GCG CTG 180	913
GCC GAG CAC ATC ACC AGC CAG GGA TCT GGA GCG AAC TTC CCT GTT ACA GCC GAG CAC ATC ACC AGC CAG GGA TCT GGA GCG AAC TTC CCT GTT ACA GCC GAG CAC ATC ACC AGC CAG GGA TCT GGA GCG AAC TTC CCT GTT ACA 190 190 195	961
CAC TTG AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC CAC TTG AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC AAC GAC ATC GTC ATC GTC ATC ATC ATC ATC ATC ATC ATC ATC ATC A	1009
AGC CAG CCA AGT CCA GAA TAC TGG ATC ACC AGT GGC ACC GGA GCC AGT Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Thr Gly Ala Ser 220	1057
GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GCG GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG ATC ACG GCG GCG GCG ATC ACG ACG GCG ACG ACG ACG ACG ACG ACG AC	1105
GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TTG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TG	1153
TIT TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA THE TIC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTG TGT TGT TGT TGT TGT TGT TG	1200
Phe Phe Alt 265 265 265 265	1250
265 AATAAGTGCG GAGAGAAGT GTAAATAGTA ATTAAGTATA TATCAGGCAG AGAAGCAGTG AATAAGTGCG GAGAGAAAGT GTAAATAGTA ATTAAGTATA TATCAGGCAG TGGAGGCGCT	1320
ANTANGTECE GAGAGANAGE CINAMITATION ACGINGCAGA TANCCACGIG IGGREGEECT GIGGICAGAG AAGAAAGAGI GAGICCCATI ACGINGCAGA TANCCACGIG IGGREGECECT GIGGICAGAG AAGAAAGAGI GAGICCCATI ACGINGCAGA TANCCACGIG IGGREGECECT	1368
GTGGTCAGAG ARGAMETEC GGCCATCAAT CATATTCTTC TCCTTACT	







₩O 98/31790

PCT/EP98/00081

- 28 -(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (1) SEQUENZKENNZEICHEN:
- - (A) LÄNGE: 297 Aminosauren
 - (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKULS: Protein
- (x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:
- Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu -27 -25 -20 -15
- Cys Ala Ala Ala Pro Thr Pro Leu Asp Val Arg Ser Val Ser Thr Ser -10 -5
- Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Pho Ser Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr , 10 15 20
- Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Asp Asp Ser Asn Val Thr Cys Thr Ala 25 30 35
- Asp Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Lys Met Leu Leu Glu 45 50
- Phe Asp Leu Thr Asn Asn Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala 55 60 65 .
- Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr
- Ile Lys Asn Trp Ile Ala Asp Leu Asp Phe Ile Leu Gln Asp Asn Asp 90 95 100
- Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp 105
- Glu Ala Ala Asp Asn Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala Met Ser
- Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly 135
- Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser 150 155 160 165
- Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Val Gly Asn Tyr Ala Leu 170 175 180
- Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Pro Val Thr
- His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe





PCT/EP98/00081

WO 98/31790

- 29 -

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Thr Gly Ala Ser

val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Leu Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala 235

Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Asp Val Leu Ala His Leu Trp Tyr 250

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu 265

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:
 - (1) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LÄNGE: 42 Basenpaare (B) ART: Nucleotid

 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN
 - (x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3: GGAATTCACC TGUTARCCAT GTTCTCTGGA CGGTTTGGAG TG
 - (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:
 - (1) SEQUENZKEHNZEICHEN:
 - (A) LANGE: 34 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (11) ART DES HOLEKÜLS: Genom-DNA
 - (ili) HYPOTHETISCH; NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4: CGGGATECAA GCTATAGCAG ACACTCTGAA ATTG

34

.42 .







WO 98/31790

-30-

PCT/KP98/00081

BUDAPESTER VERTRAG ÜDER DIE INTERNATIONALE ANERGENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MERROPÄC/ NIS;AE): FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH Kirschenallem 42

64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTATICUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG, ausgesicht gesall Regel 7.1 von der unten ausgegebenen INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGEN zugemüßes Bezugswichen: RH 3745	You der Internationalen Hinterlegungsställe Engelein eingangsnunger: DSM 11283
II, WISSENSCHAFTLICHE DESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCH	ILAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNIANO
Mil dam unter J. beneichneten Milworgenisseus wurde	
() cine whenschaftliche Beschreibung (X) cine vorgeschlagene innonmische Bezeichnung eingereicht. (Zureifendes antrettaen).	
III, EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale iffinerlegungastelle niones den sette i bezeichneten Mile Easthinserlegungs' eingegangen ist.	morganismus na. der bei ihr um 1996-11-11 (Denture der
IV. ENGANO DES ANTRACS AUF UMWANDLUND	
Der water I bezeichnese Mikroorganissuur in bei dieser letternationalen Hinter bistertegung; und ein Antrag unf Umwendung dieser Estdrigterlagung in eins eingespungen (Dahum des Eingüngs des Antrags auf Umwandung).	fegungsstelle am tingsgangen (Datum der Erst- a Hinzerlegung gesställ Budapester Vertrag in am
v. Internationale hinterlegungsstelle	
Name: DSM2-DEUTSCHE SAMORLING VON MICRODAGANISMEN LIND ZELLKULTUREN GribH Anschrif: Mischerder Weg 1b D-1812-1 Drauschweb	Unterschriften) der zur Vertretting der Internationalen Häntriegungssiehte bestigen Personien) oder des ider) von de entschätzen Bedlemmenn: Dey (Lew 18 Je. 1906–11-15

Falls Regel 6.4 Duchstake & suirfell, iss dies der Zeitpunkt. zu dem der Stants einer internationalen Hinterlegungsstelle erwerben wooden ist.

Formblee DSMZ-DPM (nimiter Selec) 0194

2

21 00 000







PCT/EP98/00081

-31-

BUDAFESTER VERTRAG LIBER DIE INTERNATIONALE ANERCONIANG DER HINTERLEGING VON MERCORGANISMEN FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFANCE I

INTERNATIONALES FORMBLATT

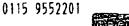
Rähm GmbH Rirschenallee 42

64293 Darmstadt

LEBENSFAHIGKEITSDESCHEINIGUNG suspensible granes Reget 102 von der unten angegebenen INTERNATIONALEN HINTERLEGINGSSTELLE

•	
	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
MINTERLEGER MONTH ROBERT ANSCHRIEBER 42 AMSCHRIEBER 64293 Darmstadt	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugezische EINGANGSNUMMER: DSM 11282 Damm der Minnertegung oder Weiterfeltung*: 1996-11-11
III. LEBENSFAHIGKETTSBESCHEINIGUNG	
Die Lebenstähigkeit des water it genammen Mikroorgansemes ist am 199 Zu diesem Leispunkt war der Mikroorgansemes)6-11-12' grpnift worden.
1), which mera inperequisity. (X7), Pepereippis	TANG MIRCHDEFURIT WORDEN 151"
IV. BEDENGUNGEN. UNTER DENEN DIG LEBENSFÄHIGKEITSPRUF	UND DO
V. INTERNATIONALE HINTERLECLINGSSTELLE	A. immunication Hinteringspress
Name: DSMZ-DEUTSCHE SANBRUNG VON NUKROORGANISMEN IND ZELLKULTUREN Gentiff Agachid: Maschender Wag 18 D-38124 Beauschneig	Unterschriften der zur Verwetung der internationalen Hinterlagsregative bestäten Ferstanden oder der ider) von übe erwachtigten Bedjedanten: Degree 22 Dansie: 1996-11-15
	Misselsenne oder cine Presentations vorgenommen worden ist. Angabe 645 Da

Ausfüllen, west die Angeles bezintrigt worden sind und wenn die Urgebaltse der Fröhorg negaür vrosen.







WO 98/31790

PCT/EP98/09081

-32-

BUDAPESTER VERTRAG OBER DIE INTERNATIONALE ANERKENNUNG DER KINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEP FUR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbB Kirschenallee 42 64293 Darmstadt

EMPRANCEBESTATIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG. ampendin pomin Ropal 7.1 van der unten ampegebenen internationalen hinterlegungsstelle

L KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER regenilles Bezogenschen: RH 3886	Von der Internationalen hinterlegengsstelle engembe eingangsverheer: DSM 11284
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UNDVODER VORGESCHI	AGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG
Mit dem unter J. bezeishnenn Milorooppinismus wurde	
() the wistenschaftliche Beschreibung [X) cisse vorgeschlagene untonomische Besteichnung cingereschu. (Impetiendes andressen).	
III. EINGANG UND ANNAHME Diese internationale Hinteriegungsstelle niment den unter 1 bezeichnesen Mikro Enskinteriegungs' eingegangen ist.	organisons en, skri bei itz em 1996-11-11 (Denum der
(V. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I begreichsete Mütrobrganismus ist bei dieser Internationalen (finterle historiepang) und ein Anne mit Umwindung dieser Bezihjnterlegung in eine vingegangen i Danum der Eingaugs des Autrags auf Umwundhungs.	gungssielle gin engegengen (Donum der Eru- Hinterlegang gemad Budapester \ erurag ist am
v. dateunationale hinterleconcestelle	
Nume: DSMZ-DEUTSCHE SAADILUNG VON ABEROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GroßH Amschrift: Maschender Wey 16 D-18124 Brownschwely	Ungerschriften) der zur Verrechung der Internationolen Hinterlegungsstelle befüggen Person en oder det odert von ihr ermachtigten Bediensneton: Dame: 1276-11075

* Falb Repel 6.4 Duchende d amifik, in dies der Zeitgenitt, zu dem der Stotus einer interandonalen Ministiegungdsselle erwernen werden ist. Formblie OSA(Z-BIP4 teltzige Scie.) 0196

34 X.





PCT/EP98/00081

-33-

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ANEXEDINUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROPPG INISTEN FUR DIE ZWECKE VON PATENTVERFANKEN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH Kirschenallee 42

64293 Darmstadt

LEBENSPAHICKEITSBESCHEINIGUNG engestellt ganza Regel 102 von der umen sugegebenen INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

	II. KONZEICHHUNG DES MIKROORGANISMUS
DITERLEGER	
	Von der Internationalen hinterlegungsstelle
Rohm GmbH	INSTITUTE EINGANGSNUMMER: DSM 11284
Ronm Guest Rirschenallee 42	
64293 Darmstadt	Danim der Himzelogung oder Weisenleitung!:
64293 Darmer-	1996-11-11
The state of the s	
1. LEBENSFÁHDGKEITSDESCHEROGING	
Die Lebenschühligkeit des unter fl. geneemen Mikroofganszeres ist om 19 Die Gesem Zelipunkt war der Mikroofganszyler	96-11-12 [†] gapnufi wordelp
OC), processyld	
), wirst meta teprastraid	
THE THE STREET WAS A STREET WAS	FUNG DURCHGEFUHRT WORDEN IST
IV. BEDDINGUNOEN, UNITER DENEN DIE LEDENSFÄHIGKEITSFRU	
	•
	·
MAKKITELLE	•
V. INTERNATIONALE HENTERLEUMOSSTELLE	And a margina blimeria discription and
V. INTERNATIONALE HINTERLEUMOSSTELLE	Unterschriften) der zur Verurening der Interpationalen Hinterlegungssti
	Unterschriften) der zur Verstetung der internationalen Himterlegungssat befugten Personsen) oder des ider) von ihr esmachtippan Bediensteinn:
Name: OSMZ-DEUTSCHE SAMMLLING VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GHIBH	pelugan Personneni paer ses auti,
Name: OSMZ-DEUTSCHE SAMMLLING VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GribH	Dayeur with
	i e e e e e e e e e e e e e e e e e e e

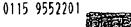
Angele des Dennes des Estelleurlegene. Wenn eine essente Hintellegung oder eine Welterleiung vorgenommen worden bis Angele des Deums des jeweils letzen erwein leinerlegung oder Weinerleurung.

In den in Regel 10.2 Deutstabe a Giffer II und ill vorgeschenen Fisikup Augste des jewein Lebensföhlerkeitsgeutung.

Austrianum apparatus. Austrianum apparatus bezontum within and and area die Erzebnisse der Palifons negotiv waren.

Fembles DSMZ-BIV9 (cinzles Sele) 6196









PCT/KP98/00081

-34-

BUDAPESTER VERTRAG ÜDER DIE INTERNATIONALE ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MEKROORGANISMEH FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERPAREN

INTERNATIONALES FORMULATT

Röhm GmbH Kirschenallee

64293 Darmstadt

EMPFANGEDESTÄTIGUNG BEI ENSTRIMTERLEGUNG. MUREUM BESIEB Regel 7.1 von der waten angegebenen INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

L KENNZEICHMUNG DES MIKROORGANISMUS		
Vom HINT	ERLEGER zugrafines Gezugszeichen;	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE
RH 30	46	EUSCHERE EINGANGSNUMMER:
		DSM 10652
II, WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UNDVODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG		
Mh dens unter I. bazzischenten Mikroorganismus wurde		
() cino wissenschaftliche Deschwibung		
(X) one purpose the descripting		
eingereicht. (Zubreifendes ankteusta).		
III, ENGANG UND ANNAHME		
Ofers internationals Hintertegungsstatte nimmt den unter i bezeichneten Mikroorgenksraft au. der bei ihr um 1996-04-24 (Datum der Erstehnertegung)' einzegangen ist.		
IV, EINGANG DES ANTRACS AUF UMWANDLUNG		
Der unter I bezeichnete Mikrworganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- histerlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung geseiß Dedapusser Vertrag ist zun eingegangen (Datum des Eingungs des Antrags auf Untwindlung).		
v. phternationale hinterlegungsstelle		
Name:	OSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH	Unterschriftlen) der zue Vertretung der Interastionalen Hinterleguogsstelle befugten Pessonen) oder des (der) von ihr ettenschipten Dediensteten:
	Mascheroder Weg 1b	
•	D-38124 Drausschweig	V. Wals
		Oznem: 1996-04-26
Will the A Red & Red William & and Control of the Art William St.		

kt, zu dem der Status einer esternatunalen fünserlegungspielle erworben worden ist, Yumbbu DSM7/I)P4 (circine Scho) 0196

31_00 2004

0115 9552201



-35-



WO 98/31790

PCT/EP98/00081

BUDAPESTER VERTRAG UDER DIE INTEINATIONALL ANERKEINUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKCOORJANISHEN FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH Kirschenallee

64293 Darmstadt

LEBENSFAHIGKEITS DESCHEINIOUNG suspenseill germal Regel 10.2 von der unten angegebenen INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

	IL KENNZEICIDIUNG DES MIKROORGANISMUS	
RÖHM GMDH Kirschenalles 64293 Darmstadt	von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE sugstollte EINGANGSNUMMER: DSM 10652 Dolum der Hiracrichena oder Weiserleinung': 1996-04-24	
n. Ledensfahigkeitsdescheinigung		
Die Labentsfahreren des weier il genammen Mülindergahlsmitt am 1990 Zu denem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (XC) kebnastblig 1) nicht meht tebenstätig IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKETISPRUFU	•	
IV. BEDINGUNGER, UNTER DELICA		
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE		
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Amethriñ: Mascheroder weg ib-D-18120 Granachweig	Underschiftlen der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungs befüglich Personten oder des (des) von ihr ermschuigten Dediensseten U. U.CC.S Datum 2996-04-26	
The binestics read. Werm cinc especial	Butchegung oder else Weisersenung vorgenon-men worden zu. Angebe des 130	

Angabe des Danum des Erschingerlegung. Wenn eine emeuns Hinterlegung oder eine Weineneitung vorgemonden war jeweils letzten erseiten Hinterlegung oder Weinerleitung.
In den in Regel 10.2 Bechstabe 3 7/Hzr II und sil vorgeschenen Falten Angabe der terzen Lebentschanzentspruisme

Ausfalten was apprenties because worden sind and went the Espelaiste des Printing nogero waten.

Foresbon DS-(Z-DPP) (ciercies sche) 0196









PCT/EP98/00081

-36-

DUDAPESTER VERTRAG UDER DIE INTERNATION.... ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIR-OOD-GANISMEJ: FÜR DIE ZWECKE VON PATRATVERFAHRUN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Róhm GmbH Kirschenalles

64293 Darmscadt

EMPPANGSBESTATICIONO DEI ERSTHINTERLEGUNO, ausgesleib eswal Repei 7.1 von der dinen angrependen internationalen hinterlegungsstelle

I. RENNZEICIENUNG DES MIRROORGANISMUS			
Vom HINTERLEGER zogeteiltes Dezigszeiten: pRC3	Von der ENTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE ENGENERE ENGANGSNUNGMER: DSM 10653		
11. WISSENSCHAFTLICHE DESCHREIDUNG UNDVOORR VORGESCH	AGENE TAXONOMISCHE DEZEICHOLING		
Adil dem umer I. besstähteta >1dromgansravs worde			
(CC) one wiscoschaffliche Dezelchismg (CC) one vorgeschlagene envonomische Dezelchismg eingereien	·····		
EINGANG UND ANNAHME			
Diese merhanonale Historiegungsstelle niment den unter i bezeichneten bisker Brussinseriegungs' eingegangsa sit.	porganizarus an, for bei libr ans 1996-04-26 (Octum dar		
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG			
Der unser i bezeichnese Ahltmorganismut ist det dieser internationalen Häner hinzertegung) und ein Annag mit Umwandhing dieser Ertifchindstegung in eine eingegangen til minn der Eingungs der Antrags auf Umwandhing).	opingsseife om engegingen (Vanum der Arn- Matteringung gewalt Dudapester Vorung uts von		
v internationale hinterlegencestelle			
Name DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON .:#KROORGANISJIE IND ZELLKULTUREN OmbH Anethrik '.hpshendor Weg ib D-28124 Dramschweig	Unicordetifies) der zw Verwoning der inverkandenden Minierkepungssielle befregien Permoting oder den iden von der einschifzen flettermissen. Unicordetifiese) der zw Verwoning der inverkandenden Minierkepungssielle befregienen.		
. 15 Mr. House of A Durch conduction and Market And Andrews St. 15 miles for the state of the st			

Tally Reset #4 High gale is autritt, hi day det Zelpsoht, zu dem der Sehrs einer internationalen | Riverteningspiele er wurden worden d

Farmillion 1983 (C.-EDP2) removing Senie) 8196

104 00 500







PCT/EP98/00081

37

BUDAPESTER VERTIAG UDER DIE INTERNATIONALE ANEIKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROOP.CANEIMEN FUR DIE ZWECKE VON PATENTVERFALIEUN

INTERNATIONALES FORMOLATT

Röhm GmbH Kirschenallee

64293 Darmstadt

LEBENSTAHIGKEITS DESCHEINIGUNG ausgeweith gemail Regel 10.2 von der unten angegebenen INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

Name: DSMZ-DIGUTSCHIE SANIMLUNG YON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH With bachtroder Wee 19		II. KENNZEICHNING DES MIKROORGANISMUS
Die Laberstabigteis des unter il gerannen Mikronganiamus ist am 1996-04-24 (geptisk worden. Zu diesem Zeinpunkt was der Mikronganiamus (X) isterstäbig (X) inch mehr iebensching IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKEITSPRUFUNG DURCNGEFÜHRT WORDEN IST* V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE Name: DSMZ-DEUTSCHE SAAIMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN Gribh MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN Gribh W. W	Pōhm GmbH Kirschenalles	DSM 10653 Damm der Hinkerlegung ader Weiterhehung':
(X) lebensikhing () inch meh lebensikhing IV. BEDRIGINGEN, LINTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKEITSPRUFUNG DURCHGEFUHRT WORDEN IST V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE Name: DSMZ-Deutschie saahmlung von Mikroorganishen und Kellkulturen Gmbh Mikroorganishen und Kellkulturen Gmbh Mikroorganishen und Kellkulturen Gmbh W. W. W. W. W. W. W.	n Ledensfahrgyettsbescherrigung	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE Underschriften) der zur Verureiung der miermaliennbled Hinterlegun beforden der des (der) von ihr ermochtigten Bedienste MIKRODRGANISMEN IND KELLKULTUREN Gribh W. C. C. C. C.	Zo diesen Zentraniang (X) tebensishing) nicht mehr tebenstähig	
Name: DSNZ-DEUTSCHE SAAIMLUNG VON MIXRODRGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Little Absolution was 1b	IV. DEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEDENSFAHIGKEITSPRUF	UNG DURCHGEFUHRT WORDEN IST
Name: DSNZ-DEUTSCHE SAAIMLUNG VON MIXRODRGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Little Absolution was 1b	TONATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	·
D-38124 Drawsschweis Danum: 1396-04-26		Unicaschvifiles) der zur Verureitung der miermationalich Hinterlegongsste beforen l'erson(en) oder des (der) von die erspechtigken Bediensteten: L. C. C. C. C. Datum: 1996-04-26

Angebe des Dassons du fürstlückerlegenig. Weine eine eineme Hinterlegung oder eine Weiterlebung, wiesperennmen wier jeweils letzten termien Hinterlegung oder Weiterlebung. da sich in Regel 10.2 Buchstabe a fallen is unm die erwystelsenen Fallen Angabe der leisten Lebenstähierkondpruheng.

Furnish DES 2-1899 (cintage scite) 81%



0115 9552201

St. 1. 102.0





WO 98/31790

-38-

PCT/EP98/00081

Budapester vertrag uder die international Anerkennung der Hinterlegung von Mikradramismen Fur die zwecke von Patentverfahren

INTERNATIONALES FORMULATE

Rõhm GmbH Kirschenallee

64293 Darmstadt

Formblatt INSAD-BPH femage Senet 0196

EMPFANGEESTATICUNG BEI ERSTEINTERLEGUNG. Beigerich (2008) Augel 7.1 von der unteil angrechanen INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSTELLE

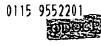
I. KENNZEICIPIUNG DES MIKROORGANISMUS Vom HINTERLEGER augeseines Bezugszeichen: Von 41 INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE ZUBCHER EINGANGSNUMMER! pKC9 DSM 10654 II. WISSENSCHAFTLICHE DESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE DEZEICHNUNG Mit dem souer I. buzustineten Mitrocogantimus wurdt (X) eine wittenschaubiche Heschreibung (X) time vorgenchingene taxonomische Bezeichnung eingereicht (Zimreilentics austreuzen) HE EINGANG UND ANNAIDE Diese internationale Historiespograntiti nimmi den uniti i begrichneten Mikroorganismus en, der bei ihr am 1996-04-24 (Danim der IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLING Der unter i bezeichnete Ahltreutgantinus au bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle um eingegungen (Datum der Erst-hinterlegung) und em Ankrag auf Umwannlung dieser Ersthinterlegung im eine Hinterlegung geneß Budspesser Vertrag ist ein chigitgangen (Datem das Blegnegs des Antrags auf Unwandleing). V INTERNATIONALE HESTERLEGUNGSSTELLE DSM2-DELTECTIE SANNILLING VOY: Umerschofifted der zur Verweimog der binermittonalen linneriegungsriefte MIKROORGAMISMIN UND ZELLKURTUREN GodH prefilter Lexicates) oper que (act.) son que communitor frequencriste. Adseptuit-Mascheroder Wee Ib D-18124 Braumpawweg V. Weites Date: 1595-04-25 * Falls Regel 6.4 Bandstors e katetti, je dies der Zenpunkt, en dem dar Status umer matamionisen Historiegangsstelle erweiten set

10

---- ANTES.

ERIC POTTER CLARKSON A FAX No. 0115 9552201

P. 050



-39-



WO 98/31790

PCT/EP98/00081

BUDAPESTER VERTRAG UDER DIE INTERNATIONALE ANEIKENNING DER INTERLEGUNG VON MIKREDE, CANSMEN FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMULATI

Röhm GmbH Kirschenallee

64293 Darmstadt

LEBENSFAHIGKEITSBESCHEIMIGUNG ausgeweiß gestaß flegel 10.2 von der unten angegebenen INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

	IL KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUR
HINTERLEGER	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE.
Rohm GmbH	supersile EINGANGSNUMMER:
Kirschenallee	DSM 10654
	Datum der Hinterkepung ader Weiterheitung :
64293 Darmstadt	Datten der Hintersegung doct
	1996-04-24
CATEGORIE CONTROLLER	
II. LEBENSFAIRCKETSDESCHEINIGUNG	
Die Lebensfehigken des unter II genommen Mikroorganismus ist am	L996-04-24 KHI WALLAN
A. meta tacpa peperatayang (20), peperatayang	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEDENSFALIIGKRITSP	RUFUNG DURCINCEPULAT WORDEN IST
IV. BEDINGUNCEN, UNTER DENEM	
• .	•
V. INTERNATIONALE INNTGREEQUNUSSTELLE	
Name: PSMZ-DELITSCILE SAMMILLING VON MERDORGANISMEN IND ZELLEVLTUREN GIAM	Unterschiften) der zur Venseumg der internationalen Hinterlegungenet. H
1	U. Wals
Anishrift: Muscherodes Weg 1b	i e e e e e e e e e e e e e e e e e e e
D-M() a promote and	Datum: 1296-04-26
	neutra Historiegung oder eine Westerteilung warpersponnen worden 100, Angabe der Liebe
Wenn cinc ern	unit Hintermany und the

Angabe der Doums des Bulbenserteignen Wenn eine erneum Hinterlegung oder eine Westerming werpernommen wert Jewest letzte erneues bismerlegung oder Weiterlemag.

10. June 19. Deckenbe in Affer is und die vergezehenen Fellen Ampaus des teinen Lebentührsekeitaprotinset.

Zanctionnes aucrevices. Ausfülles, weam die Augsbeit bezintiggs waarden sind voor viers alse Estabalisse det Brusiene steppija weven.

Formbian 11500, fire consign (eas) 0196

0115 9552201





WO 98/31790

-40-

PCT/EP98/00081

BUDAPÉSTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONAL.: AMERKENNUNG DER HUNTERLEGUNG VON MIKKOORJANIEMEN FÖR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAMFEN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH Kirschenallee

64293 Darmstadt

EMPFANCIDESTATIGUNG DEI GESTHENTERLEGUNG.

BURGHIER STROB Regel 7.1 von der miten degegebenen

BITERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I, KENNZEICHRUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zegensdes Bezugszeichen: pKC12	Von der internationalen hinterlegungsstelle zugehehr eingangsnummer: DSM 10655
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UNDVODER VORGESC	TRAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG
Mis dem unit! (. bezuschneten Mikroorganismus vininde	
(X) esse witherwich filicing Beschreibung (X) esse worgeschlagene monumaksche Bezeichnung congernicht (Zwernends beitreszen).	
ill engang und annahme	
Diese internationale Himeslegungsstelle nimme den unter i bezeichneten All Ersthimestegung) ² eingegungste ist.	teoorganissings an, day hell that have 1,996-64-24 (Datum) day
v. Dingano des antrags auf umwandlung	
Der unter i bezeietinese Mikroorganismus ist bei dieter internationalen Historiationalen Historiationalen internationalen internationalen internationalen internationalen internationalen internationalen internationalen des Eingapps des Ananags auf Universabilitätigt.	erlegungsstelle um eusgegangen (Desum der Erst- us Haterlegung gewah Dudapsster Vertrog bi am
. INTERNATIONALE IBNTERLEGUNGSSTELLE	
hame: DSMZ-DSUTSCHE SAMMLLING VON MIKROORGANISMEN UND ZEILKULTUREN Finhli **Alscharodof Weg Ib D-38124 Drawnschweig	Unterschristen) der zur Vertretung der internaumsaken Handerbezungs sielle befreiten Personten) oder des (der) von ihr ermochtiquen Heilichabenen: U. U.C. Duhame 1996-04-25
Falls Regel 6.4 Huchstabe d seariffs, in thics der Zoktumks, zu dem der Stati	us outer more parameters Libraries processes and a market
CONTROL TOTAL PORT ACCOUNTS FOR A LANGE	POLINE CHANGE MONTER IN

2

Fremhant DSAR-DP-3 (einzige Sche) 0196

21.00 000







-41-

PCT/EP98/00081

BUDAPESTER VERTRAG ÜDER DIE INTERNATIONA.... ANERKENNUNG DER BINTERLEGUNG VON MIKEOORSANISMEN FÜR DIE ZWECKE VON PATIENTVERFALBLEN

INTERNATIONALIES FORMBLATT

Rõhm GmbH Kirschenallee

64293 Darmstadt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIOUNG ausgenzik gemaß flegel 102 von der ausen angegebenza INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSTELLE

		IL KENYZEICHRUNG DES MIKROORGANISMUS		
Kir	m GmbH schenallee 193 Darmstadt	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE DIEM 10655 Datum der Hinleriegung oder Weinerleisung': 1996-04-24		
LEDENSTA	HIGKEITSDESCHEMIGUNG			
ie LebensEdi 13 diesem Zek	gkeil des onter II gemannen Mikroorgansmus ist am 199 punkt war der Mikroorgankouss	6-04-24 · Septim Reports		
, , ,	lebensfahig nicht osehr isbensfahig			
IV. BEDING	INGEN, UNTER DEMEN DIE LEDENSFAHIGKEITSPRUFU			
v INTERN	ATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	Umerschriften) der zur Versetung der internationalen Himselegungsstel		
Asschrift	USMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON 14KROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN Gobbi Abschooser Weg 16 D-381M Brannschweiß	J. W. L. W. Dobins: 1996-04-26		
<u></u>	the learning of the property of the party of the property of the party	Hinderlegung odes eine Weiserleinung vorgenommen wurden ist, Angabe des Uni in l'aden Angabe der Etiden Lebeistädigkeitegenfang in die Ergebnisse der Philippi projekte waren.		

Zimenicaecs auchimien. Ausfüllen, wenn die Angaben bedinnings worden sind und wenn die Ergebnisse der Philippe negatys waren. Zubelicades microsses

Farmblys ()SAQ-0799 (circine Scie) 0196







-42-

PCT/EP98/00081

BUDAPESTER VERTRAG DBER DIE INTERNATIONALE ANERRENOUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKRCERG INTEME! FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERPAIREN

INTERNATIONALES FORMELATT

Rôhm GmbH Kirschenallee 42

64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG. ausgestelli semiä Regel 7.1 von der annen angegebenen internationalien hinterlegungsställe

	ZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
vom HIP pRCN	NTERLEGER zugenellus Bezogsteluten: 2	. You der Internationalen Hinterlegungsstelle Bigneite Eingangsnummer DSM 11352
II. WISS	ENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORORSCH	LAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG
Mit dem'	upper I. bezeichneten Mikroorganismus wurde	
cingeresch	(X) cine wissenschaftliche Beschreibung (X) wire vorgeschingene monomische Bezeichnung	
	des ankreuzens.	•
<u> </u>		·
III. ETNO/	ANG UND ANNAHME	
		voorganischus en. der bei är zas. 1996–12–23 (Dahlen der
Diese imes Ersthiateri		voorganisanus an. der bei ör an 1996–12–23 (Danken der
Diese inter Erschieuerle IV. EINGA	mationale Himerlegungswelle nieraat den ugser I bezeickneten balle ogungs eingegangen ist.	
Diese Inica Essisional IV. EINGA Der mater II Interfeque	implionate Hinterlegungstielle nieraat den unter 1 bezeichneten Miler egung / eingegangen ist. ANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG bezeichnete Milyvoorgangstas be bei dieser internationalen Hinter eg und ein Antrag auf Umwandlung dieser Bechingerlegung in des	
Diese Inica Essisional IV. EINGA Der mater II Interfeque	mationale Himerlegungsstelle nimest den ugser i bezeicknehen biller ogung / eingegangen ist. ANG DES ANTRACS AUF UMWANDLING . bezeichnet Mitroorganisches ba bei dieser Internationalen Himerlegt und ein Antrag auf Umwandlung dieser Estabinserlegung in eine en (Ozuma des Eingangs des Antrags auf Umwandlungs).	assungstielle am eingegungen (Datum der Esst- Hintertregong germaß Budapester Verreng iss am
Diese Inter- Erschieurik IV. EINGA Der woter I binnerkepen chagegrupe	mationate Hinterlegungstielle nierent den unter 1 bezeichneten bülg opungs eingegangen ist. ANG DES ANTRACS AUF UMWANDLUNG Dezeichnete Militoorganismus bis bei dieser intuttummenten Hinterlegung in eine en Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine en 10 zum des Eingungs des Antrags auf Umwandlungs. NATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE DSMC-DEUTSCHE SAAMILLING VON	egungssielle om eingegungen (Datum der Essi- Häntertregung germaß Budapester Vertrag ist am

Pails Regel a./ Duchstage 6 meriall, its dies der Zeitpunkt. Zu dem der Sixtus einer impromoration Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

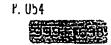
Formblas DSMZ-DP/4 (cinzing Scho) 0196

4

34.00

ERIC PUTTER CLARKSUN . FAX No. U115 9552201

0115 9552201₃



PCT/EP98/00081

WO 98/31790

-43-

BUDAFESTER VEXTRAG ÜDER DIE INTERNATIONALE ANERENNUNG DER HINTERLEGIANG VON MIKROTROVNEME! FÜR DIE ZWECKE VON FATENTVERFAHLE!

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH Kirschenallee 42

64293 Darmscadt

LEBENSFÄHIGKETTSDESCHEINIGUNG ausgestelle gestille Regel 10.2 von der linich angegebenen INTERNATIONALEN HINTERLEGINGSSTELLE

Rôhm GmbH Kirschenallee 42	U. KENNZEICHRUNG DES MIKRODRGANISMUS Von der Internationalen hinterlegungsstelle ingestie eingangsmader: DSM 11352 Denum der Hindungung oder Weignsteinung': 1996-12-23
III. LEHENSFAHICKETTSDESCHEINIGUNG Die Lebensühligkeit des unsei is genassen Mikroosganssmus ist am 1.99 (Zu diesem Zeispunks was der Mikroosganssmus ist am 1.99 ((X)' bebessühlig ()' niem mehr sebensühlig IV. BEDDIGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSPAHIGKETSPRUSU	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGENGSSTELLS Name: DSMZ-DEUTSCHE SAIMLLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Amschrift: Stascherader Weig Ib D-38124 Braunschreit	Unterschildren) det sur Verrenung der knernenonalen Minterlegungsste beforgen Personsent oder des 14er) von ihr ermochsigsen Bedlensseuer: U. W.E.C. Dannet: 1997-01-09

Angabe des Dotums der Ershlustricgung. Weste eine erneuse Hinardegung oder eine Webesleitung vorgroomsen unvelen ist. Angabe des Dotums der jeweils jetzen erneuse Minardegung oder Webescheitung.

In den in Regel 10.2 Dockstabe is Zifter is und ist vorgesohenen Fällen Angabe der letten Lebenschlickeitsprouner.

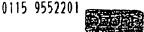
Zumefühndes abieretzen.

Ausfühltes weste die Angabe bezierens worden einel und unser die Ernelande abieretzen.

CUBICIAMIDES ABARCIGUES. AUSTRIBLEA, WERR DIE ANGISCH BEZINTRIGH WORDEN SILVE UND WERR DIE ETGEBRISSE SEI PERSONS BEGINN WORCH.

Formblan DSAIZ-DP/0 (aitzige Sein) 0196







-44-

PCT/EP98/00081

Budapester vertrag üder die internationale Anerkennung der hinterliegung von Mirronzunismen für die zwecke von Patentverjahmen

INTERNATIONALES FORMULATT

Röhm GmbH Kirschenallee 42

64293 Darmstadt

EMIFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTEINTERLEGUNG. ausgestellt gemaß Regel 2.1 von der unten ausgegebei INTERNATIONALEN HINTERLEGUNOSSTELLE

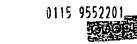
L KENN	ZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
ven HIN RH 35	ITERLEUER zugestibes Bezugszeichen:	Von der Internationalen Hinterlechnosstrile Dereiche Engangsmunder:
II. WISSI	ENSCHAFTLICHE BESCHRUBBUNG UND/ODER VORGESCH	LAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG
MSR dem u	uger (, bezeichnesen Mikroorganismus wurds	
elagereich	() eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschängene zaugnomische Bezeichung L mes pokreisen).	·
SIL EDIG/	ang und annahme	
Diese inter		roorganismus an. dur bei ihr am 1996-12-23 (Dahan dur
Diese inter Ersthisterk	rantionale Himenegungsstelle ahman den unter I bezeichneten Mile	roorganisanes an. der bei für am 1996–12–23 (Datum der
Diese inter Erstbiaterh IV. ElbiGA Der water i hinterlegen	rannonale Himzelegungswelle ahman den unter i bezeichneten Mille egong/ eingegangen ist.	
Diese inter Erstriauerh IV, EINGA Der unter i hinterlegan cingrange	rastionale Hiterricgungsstelle aleman den unter i bescichneten Milespung/ einstymgen ist. UNG DES ANTILAGS AUF UMWANDLUNG Dezsielwete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinteriali	
Diese inter Erstriauerh IV, EINGA Der unter i hinterlegan cingrange	rantonale Hinteriegungsstelle ahmne den unter i beteichneten Milesgung/ eingemann ist. UNG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG I bezeichnete Miktroorganissans ist bei dieser Internationalen Hinteriaj und ein Amrag auf Umwandlung dieser Ersthinteriegung in ein in (Danum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	legeogestelle am eingegeigen (Duram der Enst- n Hinterlegung genroß Budapener Venrug ist am Utstenschriften) der zur Vertreume der internersonale (da.)
Digw interfer Probinterfer IV. EINGA Der unter I hinarkegen chapeyange	rationale Hinterlegungsstelle abnuse des inner I bezeichneten Milesgeng/ eingegangten ist. UNG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG I bezeichnete Mikroseganisanen ist bei dieser Internationalen Hinterlegung in einen (Danum des Eingungs des Antrags auf Umwandlung). NATIONALE HINTERLEGIANGSSTELLE DSNZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON	degeogenitie om eingegengen (Denm der Erst- n Hinterlegung geord Bedapener Verrug be zm

16:

Formblas DSMZ-BPM (sinzige Sche) 0196

31-02-2004







PCT/EP98/00081

-45-

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ANERKENTUNG DER HINTERLEGING VON MIKROIRGANISMEN FOR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHPEN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH Kirschenallee 42

64293 Darmstadt

LEBENSFÄHIGKETTSBESCHEINIGUNG mergestelk geradh Regel 10.2 von der menn angegebenen. . INTERNATIONALEN HINTEILEGUNGSSTELLE

HIMTERLEGER Lance Rohm GmbH Kirschenallee 42 Anscheft 64293 Darmstadt	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE TORIGENE EINGANGSNUMMER: DSM 11353 Daten der Hintertegung oder Weiserleitung*: 1996-12-23
Die Lebenstühigkeit des unter II genunnen Mikroorganasmas ist am. 1.99 Zu diesem Zehponks war der Mikroorganasmas ist am. 1.99 (XI) lebenschaft (XI) lebenschaft (XI) nicht mehr lebenstähig 1V. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKEITSPRUFI	
V. DITERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLING VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GHISH Apadrilt: Mischeroder Weg 1b D-38124 Brunnschweig	Unterschriften) der zur Vertretung der internstionalen Hintertegungsstell bediensreten: Unterschriften) der zur Vertretung der internstionalen Hintertegungsstell bediensreten: Unterschriften) der zur Vertretung von ihr ermachnigten Bediensreten: Dahrttt: 1997-01-09

Angebe des Lieums der Eesthinkerlegung. Wenn eine erneuse Historiegung oder eine Weitsedeltung vorgenommen wurden ist. Angebe des Datume der jeweils letzten erneuse Historiegung oder Weiterlenung. In den in Regal 10.2 Burkstade a Ziffer H und is vergrechenen Fallen Angaba der letzten Lebenschligkeitsprudung.

Austilien, wend the Augusta benomigs worden such and weim die Ergeboisse der Profung auguste worm.

Ferminal DSMZ-DP/9 (clearing Scho) 0196







-46-

PCT/EP98/80081

Patentansprüche

- 1. Protein mit Phospholipaseaktivität dadurch gekennzeichnet, daß es die reife Sequenz der Aspergillus-Lysophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und an mindestens einer Stelle gespalten sein
 kann, wobei im Falle einer Spaltung die Spaltstücke entweder
 über mindestens eine unter reduzierenden Bedingungen spaltbare Bindung verknüpft sind, oder von den unverknüpften
 Spaltstücken mindestens eines Phospholipaseaktivität besitzt.
- 2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es an mindestens einer Stelle gespalten ist und die Spaltstücke entweder über mindestens eine unter reduzierenden Bedingungen spaltbare Bindung verknüpft
 sind, oder von den unverknüpften Spaltstücken mindestens
 eines Phospholipaseaktivität besitzt.
- 3. Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß die Sequenz mit Phospholipaseaktivität zu der analogen Sequenz der Aspergillus-Lysophospholipase zu mindestens 80% homolog ist.
- 4. Protein nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß es die reife Sequenz der Aspergillus foetidus-Lysophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und die Spaltstelle sich zwischen Position 44 und 45 der Aminosäuresequenz befindet.
- 5. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es aus Aspergillus-Kulturen: isolierbar ist.

31.08.00v



0115 9552201



WO 98/31790

_47-

PCT/EP98/00081

- 6. Protein nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es aus Kulturen von A. foetidus,
 A. niger oder A. oryzae isolierbar ist.
- 7. Protein mit Phospholipaseaktivität, dadurch gekennzeich net, daß es von einem Antikörper gegen gereinigte Phospholipase aus Aspergillus foetidus RH 3046 erkannt wird.
- 8. Verfahren zur Produktion eines Proteins mit Phospholipaseaktivität nach Anspruch 1 durch Fermentation eines in geeigneter Weise transformierten Lysophospholipase produzierenden Wirtsorganismus in einem geeigneten Kulturmedium und Isolierung des Proteins mit Phospholipaseaktivität aus dem zellfreien Kulturfiltrat, dadurch gekennzeich chnet,
 daß man die Fermentation im sauren bis leicht alkalischen Bereich durchführt.
- 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fermentation bei einem pH-Wert
 von 2 bis 9, bevorzugt 3 bis 8, durchführt.
- 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeich net, daß als transformierter Wirtsorganismus ein Aspergillus-Stamm oder ein Trichoderms-Stamm verwendet wird.
- 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als transformierter Wirtsorganismus
 Aspergillus foetidus oder Aspergillus oryzae verwendet wird.
- 12. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Entschleimung von pflanzlichem Öl.



0115 9552201 @



-48-



WO 98/31790

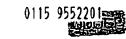
PCT/EP98/00081

13. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Backhilfsmittel.

50°

.31-08-2004







PCT/EP98/00081

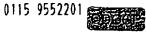
1/2

FIGUR 1: Prozessierung des Lysophospholipasegens aus Aspergillus und Erhalt der Phospholipase

LPL	CA	STTMLLF		- 0 6 5 47 1 0 2 5 7 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
SVSTS		31171CE 1-	 خ.	SH
*leichte" Kette - im SDS-Gel mit	und ohne Reduk	"schwere		
- nur eine Sequen				
PL· ohne Reduk				
SVSTSEASTTMLLEF	, ,			······················/
<u> </u>		"leichte" Ke	ette	
£,	5		S#I	*Schwere " Kette
im SOS-Gel mi	t Reduktion ca.	30 kDa uno	d ohne Re	duktion: ca. 36 kDa
- Doppelsequen	nz, Verhāltnis 1	:1		
pl mit Redul				
EASTTMLLEF	pp			
		"leichte"	Kette	
\$4 \$#	SH SH		SH	"schwere " Kette
	ao NDa Jein	-hre Kette	auft mit c	der Front daher nicht nachweisbar
- im SDS-Get - _{Dur eine} Se	ca. 30 kDa, iek quenz			
"schwere " "leichte" Ke	Kette ca. 30 kl Lte ca. 6 kDa)a		

31 08 2004

Summe ca. 36 kDa

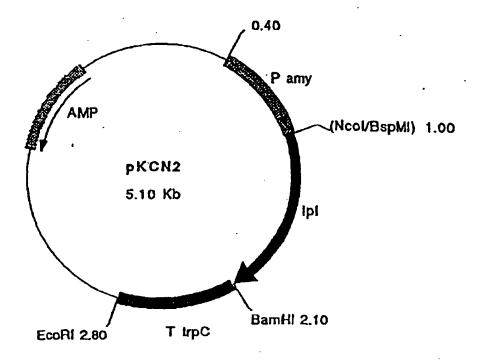




PCT/EP98/00081

2/2

FIGUR 2: Konstruktion des Plasmids pKCN2





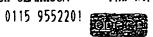


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

trite 'cast Application No PCT/EP 98/00081

	CONTRACT MATTER	C1011/15	C12P21/02	C11B3/00
CLASSIFIC	C12N9/16 C12N9/18	C15N1/12	C14, 24,	
PL 0	Ciarre, -			
			and IPC	
	demailional Paters Classification (IPC) or to be	th nesional description	44.	
XOCOMO ILI	ARCUSD			
FIELDS SI	EARCHED Invertisation resected (classification system toll 1.20 C12P C11B	owed by ciz space (put o)	MILLOUP	
inimuraco ca	C12N C12P C11B			
ire o				
_	·	to the extens that such	COCUMPANTS ALO ENCINDENCY BU	the fields searched
COMPONIATIO	on searched other than minimum-documentation	•		•
	ta base consulted during the international seed		where practical, search	lerms used)
	to have constitled during the International seen	CU (velue or core trane .	 ,	
Elections or				
o opcions	INTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		mt nessaces	Relevant to claim No.
	Chation of document, with Indication, where a	ppropriets, or the reserve		
Cason, ,				1-11
	EP 0 808 903 A (ROEHM	GMBH) 26 Nov	ember	1 * **
P,X				į
•	1997 see the whole documen	t		
				12
	NO 97 05219 A (ROEHM	GMBH		1
P,X	NO 97 05219 A (ROEHM METALLGESELLSCHAFT A	6 (DE); LOEF	LER	
	METALLGESELLSCHAFT A FRIDOLIN (DE); PL) 13	February 199	97	1
	see the whole documen	t.		{ `
	see cite who is		har	1-7,12,
	EP 0 575 133 A (SANKY	O CO) 22 Dec	embei	13
X	1 -000			8-11
i	see the whole documen	ıt		
Y	350 01-2		CUNSEN	8-11
1	WO 95 22615 A (NOVONI ALLAN (OK); CLAUSEN	DKDT2K N2 324	- OKKELS)	· • • •
Y	ALIAN (DK); CLAUSER	IR PKOIN (NY)	, ORN-2-1	l
1	I as thought 1995			l l
1	see the whole docume	Ŋτ		·
1	_			
1	· [
1				and the second
 	The manufacture of the second	of box C	X Patent tamity mos	phere are Baled in arrey.
117	unher documents are lated in the construction			and other the international filing date
1	i categories of ched documents :			
. Ebecia	white	h is not	CHOCAN TELESCOPE	Me branches as a second
-V. 900	coment defining the general state of the art which insidered to be of particular relevance insidered to be of particular relevance.		or document of particular	r playeres; the stained invertion d novel or cannot be considered to
	THE COCUMENT DAY PROPERTIES OF THE PARTY.	Manage	CRUDOL DIS COLIMINATA	eton when the document is taken alone
			"V" document of particula	It (S)BABISOS: DAS CERTIFIED RIMALATION
			CHUNCE DE COLINIONIA	White the second section of the second secon
1	hation or other special receion (as special or other special receions as oral disclosure, use, exhibiting to an oral disclosure, use, exhibiting to an oral disclosure.	Billion of	Library ency coulds	MEN DOWN
-0" 40	Stat mesus Courses commission and a president total	date bull	A, quentient member o	ithe same patent tamily
P 00	ther means comment published prior to the intermettorial filling abor then the priority date claimed		Date of mailing of th	e International secret report
	ater then the printy	<u>n</u>	Days or under of or or	
Date o	i (Ine activa) companion in commercial		25/05/19	10R
1	1009		25/05/13	
ł	5 May 1998		Authorized officer	,
1	and making address of the ISA	especificação 2		
Name of Street	ENIODOTA LIMITA CALL	2 141 TIDO1 -	Hillenb	rand. G
1		po ni.	ni i ens	
ı	Pax: (+31-70) 340-3018			

Form PCT/SAd to treeped atmentisky 1982)





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inb fonal Application No PCT/EP 98/00081

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0	808903	A	A 26-11-1997		19620649 A	27-11-1997
				AU	1997697 A	27-11-1997
				CA	2205411 A	22-11-1997
NO 9	705219	A	13-02-1997	DE	19527274 A	30-01-1997
EP 0	575133 ·	A	22-12-1993	UA	667217 B	14-03-1996
				AU	4130893 A	23-12-1993
				CA	2098421 A	17-12-1993
				FI	932758 A	17-12-1993
				ΙL	106033 A	04-01-1998
				JP	7031472 A	03-02-1995
				NZ	247891 A	26-10-1994
				US	5378623 A	03-01-1995
				US	5538874 A	23-07-1996
			•	US	5521080 A	28-05-1996
				JP	6062850 A	08-03-1994
WO 9	522615	A	24-08-1995	AU	1806795 A	04-09-1995
			•	CA	2183431 A	24-08-1995
	,			EP	074661B A	11-12-1996
				FI	963266 A	21-08-1996
				JP	9509058 T	16-09-1997

Ports PCDISA/210 (juter) birdly annuit (July 1982)



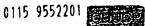


INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 98/00081

P, X	IMLER	MAIIOM	1,0,,,,,,	<u></u>
Secretarian Content Co		Almer		B3/00
South Programment Pasenthiason (Price and mean dar nationalism Risalibusion and darling Company Co	10 ACC(E)715	RUNG DES ANMELDUNOSCEGENSTANDES C12N1/15	C12h51\05	
The hierarchicalation of account of the machine and the machine of	ok 6	1209/16		
### PALES WESTERNEY DATE Management (Pales & American State of C12				
### PALES WESTERNEY DATE Management (Pales & American State of C12		and other nuch der nationalen Klassifikation	und das IPK	
### PALES WESTERNEY DATE Management (Pales & American State of C12	ch der Interna	ationalen Poterskinssification (1)-in out		
Chalcobers abor nich zum Nörzenbritstell gemöternich Vermitlenstellungen, sowes dessurzer die recherchaten Oobiese balan. ALS WESENTILCH ANCESSIONE UNTERLAGEN Lausgon* Bozeldowerg der Verditerlichung, sowes einzenbritstellungen der Institution versicht und ein I. Surzehaugenstellungen der Verditerlichung, sowes einzenbritstellung der in Betracht bermiterlich 1997 Siehe das ganze Dokument AN 97 05219 A (ROEHM GMBH) 26. November P. I. WO 97 05219 A (ROEHM GMBH) 26. November FRIDOLIN (IDE): P.) 13. Februar 1997 Siehe das ganze Dokument AN 99 5551 333 A (SANKYO CO) 22. Dezember J. 1993 Siehe das ganze Dokument AN 09 5 22615 A (NOVONORDISK AS ; SVENDSEN V 95 22615 A (NOVONORDISK AS ; SVENDSEN ALLAN (DK): CLAUSEN 18 GROTH (DK); OKKELS) 24 August 1995 Siehe das ganze Dokument **Deutrem Knädegine von angegetinen Verditerlichung der mit der nicht vorditerlichung der den "Bertanden Bertanden der Portektüng von Pale C. 20 **Deutrem Knädegine von angegetinen verditerlichung der nicht verditerlichung der punktionen Scholle vorditerlichung der von der seine Verditerlichung der von der verditerlichung der	DECUERCH.	REATE GEBIETE	_	
Chalcobers abor nich zum Nörzenbritstell gemöternich Vermitlenstellungen, sowes dessurzer die recherchaten Oobiese balan. ALS WESENTILCH ANCESSIONE UNTERLAGEN Lausgon* Bozeldowerg der Verditerlichung, sowes einzenbritstellungen der Institution versicht und ein I. Surzehaugenstellungen der Verditerlichung, sowes einzenbritstellung der in Betracht bermiterlich 1997 Siehe das ganze Dokument AN 97 05219 A (ROEHM GMBH) 26. November P. I. WO 97 05219 A (ROEHM GMBH) 26. November FRIDOLIN (IDE): P.) 13. Februar 1997 Siehe das ganze Dokument AN 99 5551 333 A (SANKYO CO) 22. Dezember J. 1993 Siehe das ganze Dokument AN 09 5 22615 A (NOVONORDISK AS ; SVENDSEN V 95 22615 A (NOVONORDISK AS ; SVENDSEN ALLAN (DK): CLAUSEN 18 GROTH (DK); OKKELS) 24 August 1995 Siehe das ganze Dokument **Deutrem Knädegine von angegetinen Verditerlichung der mit der nicht vorditerlichung der den "Bertanden Bertanden der Portektüng von Pale C. 20 **Deutrem Knädegine von angegetinen verditerlichung der nicht verditerlichung der punktionen Scholle vorditerlichung der von der seine Verditerlichung der von der verditerlichung der	PLECONE TOT	Minds-spr(metod) (Kinstellandors-specialis und		
Annead divi invernationales Plachache Vermitaines abbitonische Daterbare (Name der Daterbare und ein der Vermitätelle Suchhaugerint) ALS WESENTLECH ANGESSHOPS UNTERLAGGE Bazelohmeng der Verdienstehtung, sowes erforderfehr unser Angebe der in Bezende bortmanden Tübe P, X 1997 STehe das ganze Dokument WO 97 05219 A (ROEHM GMBH) 26. November P, X Weber das ganze Dokument WO 97 05219 A (ROEHM GMBH) 26. November I 12 WEFAILLGESELLSCHAFT AG (DE): LOEFFLER FRIDOLIN (DE): PL) 13. Februar 1997 STehe das ganze Dokument W 1993 STehe das ganze Dokument WO 95 22615 A (NOVONORDISK AS ; SVENDSEN NO 95 22615 A (NOVONORDISK AS ; SVENDSEN ALLAN (DK): CLAUSEN 18 GROTH (DK); OKKELS) 24 AUgust 1995 STehe das ganze Dokument ** Weber Manifertier on engagebaren Verdienstehungen in Jeden der Verdienstehungen der Germannen der Verdienstehungen seiner der Germannen der Verdienstehungen in Jeden der Verdienstehungen in Jeden der Verdienstehungen in Jeden der Verdienstehungen der Verdienstehungen in Verdienstehungen in Jeden der Verdienstehungen in Verdienstehungen in Stehe der Verdienstehungen der Verdienstehungen in Stehe der Verdienstehungen in Stehe der Verdienstehungen in Verdiensteh				
ALS WEDENTLECH ANGESENSK UNTERLACION Description (Name der Dassnbarit und ord) warvendeis Suchhaugents)			numer de rechercidation Geb	into tallen
ALS WEDENTLECH ANGESENSK UNTERLACION Description (Name der Dassnbarit und ord) warvendeis Suchhaugents)		An ancientation genoretie Verbilentichungen, sower des	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	
ALS WEDENTLECH ANGESENSK UNTERLACION Description (Name der Dassnbarit und ord) warvendeis Suchhaugents)	echarchierte	aber pich XXIII murantus		
ALS WESENTLICH ANGERSHOW WITERLAGEN Bearding of the Company of				us Surthandtal
ALS WESENTLICH ANGERSHOW WITERLAGEN Bearding of the Company of		Traterbank (Name de	Dataupant and evil was amount	EIE 300
ALS WESENTLICH ANGERSHOW WITERLAGEN Bearding of the Company of		resmalloration Recharche konsertione als to original		
P. X EP 0 808 903 A (ROEHM 6MBH) 26.November 1-11	Manuera aes o			
P. X EP 0 808 903 A (ROEHM 6MBH) 26.November 1-11				
P. X EP 0 808 903 A (ROEHM 6MBH) 26.November 1-11				
P. X EP 0 808 903 A (ROEHM 6MBH) 26.November 1-11		4.71		Amendary Nr
P. X EP 0 808 903 A (ROEHM 6MBH) 26.November 1-11		ENTLICH ANGESENDIE UNTERLAGEN	Betrachi kommenden Teile	Bell. Artipros 1 rt.
P.X EP 0 808 903 A (ROEHN 6MBH) 26. November 1997		Consistent of the Vertiles Bulleting, sower efforder ich uren sanger		
P. I NO 97 05219 A (ROEHM 6MBH : METALLGESELLSCHAFT AG (DE); LOEFFLER : LOEFFL	Killegode"	3410		1-11
P. I NO 97 05219 A (ROEHM 6MBH : METALLGESELLSCHAFT AG (DE); LOEFFLER : LOEFFL		A (ROFHM GMBH) 25. Novem	ber	1
P. I NO 97 05219 A (ROEHM 6MBH : METALLGESELLSCHAFT AG (DE); LOEFFLER : 13	PY			
P.X Weders Varidandichungan anders Fortselburgen van Fald C zo Weders Varidandichungan anders Meritandichungan van Varidandichungan zu va	' '^			1
P.X Weders Varidandichungan anders Fortselburgen van Fald C zo Weders Varidandichungan anders Meritandichungan van Varidandichungan zu va	, 1	stehe das ganze porta		12
Impact I			•n	1
Impact I	PY	WO 97 05219 A (KALT AG (DE); LOEFFLI	K .	İ
FRIDOLIN (DLF.) To stehe das ganze Dokument FP 0 575 133 A (SANKYO CO) 22.Dezember 1-7,12, 138-11 8-11 Wester Verifisesitioning of the day ganze Dokument Fishers Dokument of the majorishina Stand day Technik district, and ganze of the production of the day ganze of	۲,۰	METALLGESELLSCHAU 13 Februar 1997	•	
FP 0 575 133 A (SANKYO CO) 22.Dezember 1-7, 12, 13 1993 1993 19	\	FRIDOLIN (DE). Dokument		l l
FP 0 575 133 A (SANKYO CO) 22.Dezember 1393 1993 1993 1994 1995 1995 1996 1995 1996 1996 1996 1996	1	-icho das dance pontate		1-7,12,
1993 Siehe das ganze Dokument Siehe das ganze Dokument Wildere Varidaralichungsin sind der Forsalizung von Feld C zu vollenbymen Siehe das ganze Dokument Wildere Varidaralichungsin sind der Forsalizung von Feld C zu vollenbymen Pascendere Kasegorian von engegebenen Verbiererichungsin von engegebenen Verbiererichungsin von engegebenen Verbiererichungsin von beschaften von engegebenen Verbiererichungsin von der Verbiererichungsin verbiererichungsin verbiererichungsin von der Verbiererichungsin von deservor verbiererichungsin der Verbiererichungsin d	i .	A (SANKYO CO) 22. Dezem	ber	13
1993 Siehe das ganze Dokument Siehe das ganze Dokument William (DK); Siehe Anharge Siehe das ganze Dokument Siehe Anharge Siehe das ganze Dokument William (DK); CLAUSEN IB GROTH (DK); OKKELS) 24. August 1995 Siehe das ganze Dokument William (Siehe das ganze Dokument (Siehe das ganze Dokument (Siehe das ganze Morbinam (Siehe Ganz	1	EP 0 575 133 A CSAILLE		8-11
Webers Verbisenschargen sinder Portsetzung von Feld C zo enterfram Kategerien von angegebenen Verbisenschargen : *** ** ** *** *** *** *** *** *** ***	1.^	1993 ··· nokument		
Webers Verbisenschargen sinder Portsetzung von Feld C zo enterfram Kategerien von angegebenen Verbisenschargen : *** ** ** *** *** *** *** *** *** ***	١v	siehe das ganze	netal	8-11
ALLAN (DK); CLASTER 24. August 1995 STahe das ganze Dokument Weiters Verlüseslichungen einder Fortseizung von Feld C zo "Bestindere Kastgorise von eingestenen Verlüserlächungen "Bestindere Kastgorise von eingestenen Verlüserlächungen "Verlüseslichung, die den zigsmehren Stand der Technik dalfriert, "A" verlüseslichung, die den zigsmehren Stand der Technik dalfriert, "A" verlüseslichung, die gestinden sondern sich ders internationalen "Säherse Dokumen, des jedoch seit gen oder nach dem internationalen "Verlüsenlichung, die gestind bit, denn Priorstätesangsdassen einstern stahen seitgenden bei Perleitung der gestinden verlieren beitrich zu beitren, oder dasch die das Verrüsenlichungsdassen einstern einstern verlieren beitrichtung eine Aussehlung stellt ein der verlieren beitrichtung eine Aussehlung eine Einne einem eine zusehlung eine Aussehlung	1.		VANES C.)	
Weiter Varidanslichumsen bindder Fortastung von Feld C zo Weiter Varidanslichumsen bindder Fortastung von Feld C zo *Bearter Kasegoften von angegeberen Verbierdicherigen *Neurober Kasegoften von angegeberen Stand der Technik delirbert, aber nicht alb besonders andersten schausen von der des in angegeben bit Averbierdichung, de den angegeben bit der des hebendersten verbierdich worden ist Averbierdich worden ist Averbierdich worden ist Production verbierdich	l Y	NO 95 22013 KI AUSEN IB GROTH (DK);	UKKECSI	l l
Weiter Verbianitionungen einder Fortsetzung von Feld C zu T Spänse Verbierstlichung, die gesch dernitsterreitengen einder Kasegorten von engegebenen Verbierstlichungen der Technik desirniert, aber nicht als besonders bedauten zurzusehen ist T Spänse Verbierstlichung der Spänse bedauten zurzusehen ist T Verbierstlichung der gestigen bedauten zurzusehen ist T Verbierstlichung der gestigen zu besonder der Rutzuggen der Spänsen verbierstlichung der Spänsen verbierstlichung der Spänsen verbierstlichung der Spänsen der Verbierstlichung von besondere Bedautung der beanspruchte Either zurgunderen der der Rutzuggen der Spänsen verbierstlichung von besondere Bedautung der beanspruchte Either erzugen eine Bedautung der beanspruchte Either erzugen der der Aussehalt betrachte erzugen der Bedautung der beanspruchte Either verbierstlichung der beanspruchte Either verbierstlichung der seine Federachten besonderen Bedautung der beanspruchte Either verbierstlichung der beanspruchte Either verbierstlichung der beanspruchte Bedautung der beanspruchte Either verbierstlichung der beanspruchte Either verbierstlichung der beanspruchte Bedautung der beanspruchte Either verbierstlichung der beanspruchte Bedautung der	1	ALLAN (UK); CENDE		1
Weitere Verliderslichung den nich der Fortsetzung von Feld C zu "Beschdere Kategorien von eingegeberen Verbiterslichungen "A Verliderslichung, die den zigemehren Stand der Technik delinten, "A Verliderslichung, die den zigemehren Stand der Technik delinten, "Beschdere Kategorien von eingegeberen Verbiterslichung der der der Beschderen zugemehren bit "Besten Dokumen, den jedech eral jen oder nach desse internationalen "Eilers Dokumen, den jedech eral jen oder nach desse internationalen "A verliderslichung, die gesigne bit, denen Prioditiessrapruch zweiselnaß er schleren zu jeseen, oder durch des den verbiterslichungsbetren eiler schleren zu jeseen, der		24. August 1993 nokument		Į.
Wedere Verldentkohmsjen sindder Forestzung van Feld C. 20 onthehmen *Basendere Kastgorien von angegebenen Verbiterdichengen *A. Verldentischung, die den zigemehen Stand der Technik daffrient, A. Verldentischung, die den zigemehen Stand der Technik daffrient, A. Verldentischung die den zigemehen Stand der Technik daffrient, Bernalde zu und besonders bedautern andersein bit *Brenalde zu besonders bedautern andersein bit *Brenalde zu besonders bedautern andersein bit *Propriete Dottument, den jedoch und am oder nach dem internationation *Propriete Dottument, den jedoch und am oder nach dem internationation *Propriete Dottument, den jedoch und am oder nach dem internationation *Propriete Zugenstein zu den seinen dem verbindischung seine zu der nach zugenstein zu beson, der dass de Gas Verbflentischung gebrecht werden eine der der standen dem verbindischung verbindischung gebracht werden sein der verbflentischung der beunspruchte Einne anderen bin Rechercherberkoft genennten Verbflentischung bedauten verbindischen Petrachte sein der verbflentischung von besonderen Bedautung; die Deutschal verbindischen Petrachte sein der verbflentischung von besonderen Bedautung; die Deutschal verbindischen verbflentischung von besonderen Bedautung; die Deutschal verbindische Orreiterung und werden, wenn die Verbflentischung enbracht verbindischen gebracht werden, wenn die Verbflentischung enbracht in Verbindung gebracht werden, wenn die Verbflentischung enbracht werden verbinding ift seine Facturen nahet genen die verbindischen Petrachte verbindig int seine Facturen nahet genen der standen verbindig int seine Facturen nahet genen der standen verbindig int seine Facturen nahet genen der standen verbindig ist seine Facturen verbindig ist seine Gassen verbindig ist seine	1	siehe das ganza		·
Wedere Verldentkohmsjen sindder Forestzung van Feld C. 20 onthehmen *Basendere Kastgorien von angegebenen Verbiterdichengen *A. Verldentischung, die den zigemehen Stand der Technik daffrient, A. Verldentischung, die den zigemehen Stand der Technik daffrient, A. Verldentischung die den zigemehen Stand der Technik daffrient, Bernalde zu und besonders bedautern andersein bit *Brenalde zu besonders bedautern andersein bit *Brenalde zu besonders bedautern andersein bit *Propriete Dottument, den jedoch und am oder nach dem internationation *Propriete Dottument, den jedoch und am oder nach dem internationation *Propriete Dottument, den jedoch und am oder nach dem internationation *Propriete Zugenstein zu den seinen dem verbindischung seine zu der nach zugenstein zu beson, der dass de Gas Verbflentischung gebrecht werden eine der der standen dem verbindischung verbindischung gebracht werden sein der verbflentischung der beunspruchte Einne anderen bin Rechercherberkoft genennten Verbflentischung bedauten verbindischen Petrachte sein der verbflentischung von besonderen Bedautung; die Deutschal verbindischen Petrachte sein der verbflentischung von besonderen Bedautung; die Deutschal verbindischen verbflentischung von besonderen Bedautung; die Deutschal verbindische Orreiterung und werden, wenn die Verbflentischung enbracht verbindischen gebracht werden, wenn die Verbflentischung enbracht in Verbindung gebracht werden, wenn die Verbflentischung enbracht werden verbinding ift seine Facturen nahet genen die verbindischen Petrachte verbindig int seine Facturen nahet genen der standen verbindig int seine Facturen nahet genen der standen verbindig int seine Facturen nahet genen der standen verbindig ist seine Facturen verbindig ist seine Gassen verbindig ist seine	1			
Wedere Verldentkohmran sind er Forsetzung van Feld C. zo onterhinnen *Basendere Kaetgorien von angegeberen Verbistrakteragen *A. Verldentischung, die den zigemehen Stand der Technik daffreit, aber nicht als besondere bedaufsen anzusehen bit *Besendere Kaetgorien von angegeberen Verbistrakteragen *A. Verldentischung, die den zigemehen Stand der Technik daffreit, aber nicht als besondere bedaufsen anzusehen bit *Britischung des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf besonden Prinzipa *Propr	Į			
Wedere Verldentkohmran sind er Forsetzung van Feld C. zo onterhinnen *Basendere Kaetgorien von angegeberen Verbistrakteragen *A. Verldentischung, die den zigemehen Stand der Technik daffreit, aber nicht als besondere bedaufsen anzusehen bit *Besendere Kaetgorien von angegeberen Verbistrakteragen *A. Verldentischung, die den zigemehen Stand der Technik daffreit, aber nicht als besondere bedaufsen anzusehen bit *Britischung des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf des jedoch sind am oder nach dem kriemstionsten *Propriet auf besonden Prinzipa *Propr	1		Y . Stehn Anherry Peterdan	n De
**Basenders Kaetgrien von angegeberen Verbiserschartgerin **Passenders Kaetgrien von angegeberen Verbiserschartgerin **A verbierstlichung, die den zitgemeins Sternd der Technik definient, **Ar verbierstlichung, die besonders bedeuten stromseinen bei **Destination und besonders bedeuten werden ist **Armitierstlichung, die besonders bedeuten werden ist **Armitierstlichung, die pastgest bi, aben Prioritiessmerund zweitenbeiter **Armitierstlichung, die geligset bi, aben Prioritiessmerund being werden **Scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung beloeit werden **Scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung beloeit werden **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung beloeit werden **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung der bei unter **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung der bei unter **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung der bei unter **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung der des met **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung der bei **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung der beimer zu **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung der beimer zu **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung der scheiten zu **scheiten zu lassen, oder dusch die Gas Verbillerstlichung der scheiten zu **scheiten zu z	1=	A confidentification sind der Fortestzung von Feld C zu	A 1	nuch deminternettorraten Anmaktedatun
** Bastonders Kastegofen von angegenen Stand der Technik dasfirierit, **A* Verführeitlichung, die den zilgemeinen Stand der Technik dasfirierit, **A* Verführeitlichung die den zilgemeinen Stand der Technik dasfirierit, **Täters Dottumen, den jedoch und im oder nach dem internationalen **Täters Dottumen, den jedoch und im oder nach dem internationalen **Technik angegeben bit **Theorie ang	151	Methor Ventural	Spārase Vertifierklichers, os orter dem Prioritälsdeium ve	roflentlicht worden ist und mit der
** Veröffentlichung, die den zigenterun veröffentlichen vor den hehren den bedreiten anderen den bedreiten anderen den bedreiten veröffentlichung von besonderen Bedeutung, die beanspruchte Eitind ** Veröffentlichung von besonderen Bedeutung, die beanspruchte Eitind ** Veröffentlichung von besonderen Bedeutung, die beanspruchte Eitind ** Veröffentlichung von besonderen Bedeutung, die beanspruchte Eitind schrieben zu beson, oder duch die das Veröffentlichung belooft werden enderen be Bedeutung die veröffentlichung bei betreit besonderen Bedeutung, die beanspruchte Eitind sein der die ein absweiten Veröffentlichung bei betreit der veröffentlichung von bezinderen Ziegenber von betreit der veröffentlichung die veröffentlichung die veröffentlichung die veröffentlichung die ver dem bisentlichungen mitterhalben veröffentlichung, die Migded derseiten Prioritäbischen veröffentliche worden ist dem beanspruchten Prioritäbischen veröffentliche worden ist dem beanspruchten Prioritäbischen Padreiten Prioritäbischen veröffentliche worden ist dem beanspruchten Prioritäbischen Padreiten		dem Kategorien von angegebenen Veronsen und Technik definien,	Arymeldung rezik de ingeside	n Prinzipe oder der Re zugrundelingende
Theres Dolument, des jadech and an odder flacts and production worden int. 1 - Variditerifichung, die paelgard bi, aben Priordifichengedatum einer stehen zu jabenen, oder dusch die das Verofelentichungsdesten einer einer stehen zu jabenen, oder dusch die das Verofelentichungsdesten einer einer einer einer einer eine seiner einer seiner seiner seiner seiner seiner seine seiner	-A- Va			eror Bacteliturur die beanspruchte Eiffind
1— Veröffenlichung, die peelgreef bit, dern die Gas Veröffenlichungsdesien aufleren zu jassen, oder dach die Gas Veröffenlichung belegt werden zu der die sein offende der die sein anderen der gemannten Veröffenlichung der schreiben zu der mehr werden zu der die sein allemen hendrosten Grund engegeben tei jede en der die sein einen derndzen der mehr werden, wern die Veröffenlichung master der mehr werden, verm die Veröffenlichung der mehr die veröffenlichung der veröffenlichung der Veröffenlichung der veröffenlichung master der mehr die veröffenlichung master der mehr der mehr der veröffenlichung master der mehr der veröffenlichung master der mehr der mehr der veröffenlichung veröffen, vern der veröffenlichung der ver	1 **	per the series and order 178001 to the series of	C Verbianticiania von	Veroitentactung nacts ale neu oder nut
1.º Veröffentlichung, die geeigne in der dach die Gas Veroffentlichung beingt werden scheinen zu jassen, oder dach die Gas Veroffentlichung being werden scheinen zu jassen, oder dach die stein der dach veröffentlichung der gescheinen zu jassen zu der gescheinen zu der	15"	enst Community Augitautics worden are	estinderscher Tätighen ber	meno pagatrani apparatri Emind
and make the process of the manufacture of the manu	1	and a the bathle, the same was	A- Aeleumischfied Ach pasmit	that Yalidad benibered betrachial
and make the process of the manufacture of the manu	5	indepen the Recharchersbericht generation Grand angegeben tel (Mile	weether, were die Verbier	tologorio in Vertifictung gebracht wild tin
To veröffentlichung, die Anseellung oder andere Material in		of both constants		
P. Verifiereillerung, die vor dem der verifierenbichtworden ist dem bearesprechten Prioritikachken verörtenbichtworden ist dem bearesprechten Proritikachken Rechterchte Datum des Aberchkress der Internationalen Rechterchtenbehorde 5, Mai 1998 Name und Posterrachten der Internationalen Rechterchtenbehorde Europäisches Pastelland, P.B. 5818 Paleniliaan 2. Nill- 2200 HW Rijsell, Nill-	-c-v	ordientichung, die sich pus eine under andere Maßnehmen Dezens	A THE PROPERTY OF THE PROPERTY	D 2010010 + 1
Datum des Abucchiusses der Internationalen Reicherche 5. Mai 1998 5. Mai 1998 Neume und Postarechnin der Internationalen Reicherchenbehörde Europäisches Peetiland, P.B. 5018 Palaniliaan 2 Europäisches Peetiland, P.B. 5018 Palaniliaan 2 Nil- 2010 HW Rijanilia	1 1	augustigation on any one and one and the property worders at	Absencedature des interna	Monaten Plactieschenichtenchie
Datum des Abechisses der Insertationales 25/05/1998 5, Mai 1998 Neurie und Postanectvin der Internationales Recharchenbehörde Europäisches Peanland, P.B. 5016 Palentiaan 2 Europäisches Peanland, 7s. 31 651 apo ni. Hillenbrand, 6	17	dem bekrespection Personal College City		
5. Mai 1998 Neume und Pastametrish der Internationalen Recharchenbehorde Europäisches Peantant, P.B. 5010 Palenttiaan 2 Europäisches Peantant, P.B. 5010 Palenttiaan 2 NI 2200 HV Rijeuff	Datus	n det Abscribsent de Ham	25/05/1998	
Nume und Postarectus der Internationalen Recharctembehonde Europäisches Peatriant, P.B. 5018 Palentikaan 2 Europäisches Peatriant, P.B. 5018 Palentikaan 2 NL-2290 HV Riper® NL-2290 HV Riper® NL-2290 HV Riper® NL-2290 HV Riper®	ł			
Neume und Postarectum der Internationalen Recharctsenbenotous Europäisches Peantamit, P.B. 5016 Palentinan 2 Europäisches Peantamit, P.B. 5016 Palentinan 2 NI 2200 HW (Ripud) N	1	5.Mai 1998	Bevoltmachigler Bediens	
M1. 2000 HW REWER IL 21 051 aport. H1 1 (ellu) and 1		Personatività der Internationalien Recharchembehörde		
M 2290 240 2700, Tr. 21 651 aports	Maca	Europaisches Peterlant, P.B. 5818 Paterman	Hillenbrane	1, 6
	1	NL - 2200 740 2000, Tr 31 651 apo ru	111111111111111111111111111111111111111	
Fat: 1-51-70) 340-3915	. 1	FAC (+31-70) 340-3915		

Femilial PCTASA219 (Stat 2) (A& 1992)





INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

	HELK	na Aktorizaicho:
PCT	/EP	98/0008

un Pecherchanberk ngeführles Patanadok		Datum der Veröffentlichung	Milgfiedjer) der Petentlamilie		Datum der Veröffentlichung 27~11-1997
EP 0808903 A		26-11-1997	DE	19620649 A	
_			AU	1997697 A	27-11-1997
			CA	2205411 A	22-11-1997
WO 9705219	Α	13-02-1997	DE	19527274 A	30-01-1997
EP 0575133 ·	A	22-12-1993	AU	667217 B	14-03-1996
- ,			ΑU	4130893 A	23-12-1993
			CA	2098421 A	17~12-1993
			FI	932758 A	17-12-1993
			IL	106033 A	04-01-1998
			JP	7031472 A	03-02-1995
			NZ	247891 A	26-10-1994
•			US	5378623 A	03-01-1995
		•	US	5538874 A	23-07-1996
			US	5521080 A	28-05-1996
			JP	6062850 A	08-03-1994
WO 9522615	A	24-08-1995	AU	1806795 A	04-09-1995
			CA	2183431 A	24-08-1995
			EP	0746618 A	11-12-1996
•			FI	963266 A	21-08-1996
			JP	9509058 T	16-09-1997

POINTENIE PCT/BAQ10 (Anthony Policy

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:
BLACK BORDERS
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
☐ FADED TEXT OR DRAWING
BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
GRAY SCALE DOCUMENTS
☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.